



Inês Santos Pereira

Licenciatura em Bioquímica

**Implementação do método analítico
para determinação de aminas
biogénicas em amostras de pescado e
produtos de pesca. Avaliação de
processos para a sua formação.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia
e Segurança Alimentar

Orientador: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Coorientador: Doutora Carla Alexandra Fino Alberto da Motta,
Técnica de Diagnóstico e Terapêutica de 1ª classe, Instituto
Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Júri:

Presidente: Professora Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL
Vogais: Doutora Cláudia Isabel Medeiros Afonso, IPMA
Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão
Leitão, FCT/UNL



Inês Santos Pereira

Licenciatura em Bioquímica

**Implementação do método analítico
para determinação de aminas
biogénicas em amostras de pescado e
produtos de pesca. Avaliação de
processos para a sua formação.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia
e Segurança Alimentar

Orientador: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Coorientador: Doutora Carla Alexandra Fino Alberto da Motta,
Técnica de Diagnóstico e Terapêutica de 1ª classe, Instituto
Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Júri:

Presidente: Professora Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL
Vogais: Doutora Cláudia Isabel Medeiros Afonso, IPMA
Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão
Leitão, FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2018

Copyright

“Implementação do método analítico para determinação de aminas biogénicas em amostras de pescado e produtos de pesca. Avaliação de processos para a sua formação”

Copyright © 2018- de Inês Santos Pereira, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Implementação do método analítico para determinação de aminas biogénicas em amostras de pescado e produtos de pesca. Avaliação de processos para a sua formação

Agradecimentos

Após a conclusão desta dissertação no mestrado em tecnologia e segurança alimentar, quero deixar os meus sinceros agradecimentos e consideração a todos aqueles que estiveram presentes e contribuíram para a sua realização.

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à Doutora Carla Motta, por toda a ajuda, preocupação, confiança, paciência e amizade ao longo deste projeto. Por todo o conhecimento e por toda a dedicação demonstrada, um grande obrigada por se encontrar sempre disponível e presente.

À Doutora Rosália por todo o carinho, paciência e amizade sempre demonstrados. Por todo o incentivo, ajuda, conhecimento e por toda a preocupação. Agradeço também por todo o otimismo e pela boa disposição que sempre transmitiu ao longo desta grande etapa.

À Professora Ana Lúcia Leitão, pela sua disponibilidade e incentivo constante, pela sua preocupação, dedicação e otimismo.

À Doutora Maria Antónia Calhau, Coordenadora do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN), no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), por ter permitido esta experiência enriquecedora, quer a nível pessoal quer a nível profissional.

À Eng.^a Cristina Belo Correia por toda a ajuda e simpatia constante.

À Inês Delgado por se encontrar sempre disponível para me esclarecer e ajudar.

Aos meus amigos do Instituto, Mafalda Silva, Mariana Andrade, Mariana Ribeiro, Frederico Castro e Tiago Moreira por todas as gargalhadas e boa disposição. Obrigada por todo o apoio, ajuda, conhecimento e companheirismo.

À Andreia por toda a amizade que já deixa saudade, por toda a boa disposição, palhaçadas e risadas. Um grande obrigada pela ajuda e por todos os momentos de desanúvio.

Aos meus grandes amigos alcobacenses Mariana Henriques, Pedro Marques e David Delgado que me acompanham desde sempre e que vão comigo no coração para onde quer que eu vá. Um grande obrigada pelo apoio de sempre, pela vossa boa disposição e carinho.

À minha amiga Marlene, por todas as risadas, boa disposição, conselhos e incentivo. Por todas as gargalhadas e indignações, por toda a paciência e também por toda falta dela quando foi preciso. Obrigada por teres estado sempre presente ao longo de toda esta fase, sem ti teria sido muito mais difícil.

Gostaria de agradecer também ao Leonardo por toda a compreensão, disposição e presença constante. Obrigada pelo incentivo, e por todo o amor e carinho. Obrigada por teres sempre resposta às minhas inseguranças, incertezas e desvaneios.

À minha irmã Rita por todo o carinho, boa disposição, preocupação e afeto ao longo não só desta dissertação, mas da vida. Obrigada mana por teres sido sempre a companheira incansável das brincadeiras, por seres a minha confidente e a minha melhor amiga.

Aos meus avós, Filomena e António por serem incansáveis com a neta. Obrigada pela preocupação mais que constante e por todo o apoio incondicional. Agradeço com todo o meu coração o carinho e o afeto sempre partilhado.

À minha avó Lurdes pela grande mulher e avó que sempre foi. Nunca vou esquecer a força de vontade, a energia e a coragem que sempre a caracterizaram. Obrigada avó por todo o amor e dedicação.

À minha tia Vera e ao meu priminho Cristiano, obrigada tia por seres sempre a pessoa mais divertida e descontraída da sala, obrigada por todo o apoio, por escutares os meus

desabafos e teres sempre uma palavra de incentivo para me animar. Obrigada priminho por seres o mais pequenino da família, por me fazeres rir e esquecer as preocupações, espero que demores a crescer.

Por último mas mais importante, quero agradecer aos meus pais por todo o amor incondicional. Não existem palavras que cheguem para agradecer a preocupação constante, o apoio e a dedicação ao longo destes anos. Agradeço pela paciência, pelos desabafos, pelos incentivos e pela força que sempre me deram.

Não posso também deixar de agradecer por terem permitido e acreditado na minha formação.

Resumo

Com este trabalho pretende-se implementar um método para a determinação e quantificação simultânea de cinco aminas biogénicas, histamina, putrescina, cadaverina, tiramina e triptamina em amostras de atum fresco, atum em conserva e camarão congelado.

Foram simultaneamente efetuados ensaios de contagem e identificação bacteriológica, de forma a aferir a existência de relação entre a concentração de aminas e a carga microbiana presente na matriz.

A metodologia analítica inclui uma extração das aminas com ácido tricloroacético 5% (m/v). A separação e a quantificação dos analitos foi efetuada por cromatografia líquida de ultra eficiência, com detetor de díodos.

Para garantir os parâmetros de qualidade do método foram avaliados, gama de trabalho, linearidade, limite de deteção, limite de quantificação, recuperação e precisão.

Nas amostras em conserva as concentrações máximas de histamina, putrescina e cadaverina quantificadas foram $521,0 \pm 43,1$ mg/kg; 2844 ± 32 mg/kg e $52,80 \pm 3,56$ mg/kg, respetivamente. Nas amostras de atum fresco após 120 horas a $3 \pm 2^\circ\text{C}$ foram determinadas as concentrações máximas 1544 ± 83 mg/kg para a histamina, 2602 ± 709 mg/kg para a putrescina e 1044 ± 72 mg/kg para a cadaverina. No camarão as concentrações máximas atingidas foram 3790 ± 67 mg/kg para a histamina, 2498 ± 450 mg/kg para a putrescina e de $578,0 \pm 135,0$ mg/kg para cadaverina. As aminas tiramina e triptamina não foram detetadas nas matrizes analisadas.

Nos ensaios de identificação microbiológica destacam-se as estirpes *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Staphylococcus epidermidis*, *Citrobacter freundii* e *Shewanella putrefaciens*, conhecidas como produtoras de aminas, especialmente histamina.

O método revelou-se adequado à quantificação dos analitos em estudo. Das 12 amostras analisadas, 8 revelaram valores de histamina superiores aos valores máximos legislados. As condições de conservação evidenciaram, no atum fresco e no camarão, poder influenciar o desenvolvimento de microrganismos e consequentemente o aumento das aminas biogénicas.

Palavras-Chave: Cadaverina, Putrescina, Tiramina, Triptamina, Histamina, Atum fresco, Atum em conserva

Implementação do método analítico para determinação de aminas biogénicas em amostras de pescado e produtos de pesca. Avaliação de processos para a sua formação

Abstract

This work intends to implement a method for the simultaneous determination and quantification of five biogenic amines, histamine, putrescine, cadaverine, tyramine and tryptamine in samples of fresh tuna, canned tuna and frozen shrimp.

At the same time, bacteriological counting and identification tests were performed in order to verify the existence of a relationship between amine concentration and the microbial load present in the matrix.

The analytical methodology includes an extraction of the amines with 5% trichloroacetic acid (m/v). The separation and quantification of the analytes was carried out by liquid chromatography of ultra efficiency, with diode detector.

To guarantee the quality parameters of the method were evaluated, range of work, linearity, limit of detection, limit of quantification, recovery and precision.

In the preserved samples the maximum concentrations of quantified histamine, putrescine and cadaverine were 521.0 ± 43.1 mg/kg; 2844 ± 32 mg/kg and 52.80 ± 3.56 mg/kg, respectively. In fresh tuna samples after 120 hours at $3 \pm 2^\circ$ C the maximum concentrations of 1544 ± 83 mg/kg for histamine, 2602 ± 71 mg/kg for putrescine and 1044 ± 72 mg/kg for cadaverine were determined. In shrimp the maximum concentrations reached were 3790 ± 67 mg/kg for histamine, 2498 ± 450 mg/kg for putrescine and 578.0 ± 135.0 mg/kg for cadaverine. The tyramine and tryptamine amines were not detected in the analyzed matrices.

In the microbiological identification tests the strains *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Staphylococcus epidermidis*, *Citrobacter freundii* and *Shewanella putrefaciens*, known as amine producers, especially histamine.

The method proved to be adequate for the quantification of the analyzed analytes. Of the 12 samples analyzed, 8 revealed histamine values higher than the legislated maximum values. The conservation conditions showed, in fresh tuna and shrimp, to influence the development of microorganisms and consequently the increase of biogenic amines.

Key-Words: Cadaverine, Putrescine, Tiramine, Triptamine, Histamine, Fresh Tuna, Canned Tuna

Implementação do método analítico para determinação de aminas biogénicas em amostras de pescado e produtos de pesca. Avaliação de processos para a sua formação

Índice de Matérias

1.- Objetivos e enquadramento do tema.....	1
2- Caracterização do instituto.....	3
3- Revisão Bibliográfica.....	5
3.1- Aminas biogénicas: Origem e classificação	5
3.2- Aminas Biogénicas: Alimentos	8
3.3- Aminas Biogénicas: Toxicidade.....	10
3.4-Aminas Biogénicas: Legislação	12
3.5- Índice de qualidade	12
3.6- Metodologias analíticas para a deteção e quantificação de aminas biogénicas	13
3.6- Cromatografia Líquida: Fundamentos e princípios teóricos.....	15
3.6.1- Equipamento de UHPLC	16
3.7- Parâmetros de controlo de Qualidade e validação	18
3.8- Aminas Biogénicas: Microrganismos produtores	23
3.9- Metodologias de identificação de microrganismos produtores de aminas	24
3.9.1- Metodologias de identificação de microrganismos: Testes automatizados	25
4- Materiais e Métodos.....	27
4.1- Amostras.....	27
4.1.1- Preparação das amostras.....	28
4.2- Laboratório de Química - Quantificação das aminas biogénicas	29
4.2.1- Reagentes e padrões	29
4.2.2- Equipamento.....	30
4.2.3- Preparação de soluções	30
4.2.4- Extração das amostras	31
4.2.5- Derivatização das amostras	31
4.2.6- Análise cromatográfica	31
4.3- Laboratório de Microbiologia- Determinação, quantificação e identificação de microorganismos.....	32
4.3.1- Meios de cultura e reagentes	32
4.3.2- Equipamentos:	33

4.3.3- Análise microbiológica das amostras de atum fresco e camarão	33
4.3.4- Análise microbiológica das conservas de atum.....	37
4.3.5- Identificação das estirpes	37
5.- Resultados e Discussão.....	39
5.1- Implementação do método analítico:	39
5.2 - Desempenho do método analítico.....	42
5.3-Análise de amins biogénicas em amostras de atum fresco e em conserva por cromatografia líquida de ultra pressão	45
5.4-Análise de amins biogénicas em amostras de camarão por cromatografia líquida de ultra pressão: Estudo preliminar	48
5.5-Análise microbiológica amostras de atum fresco e em conserva	50
6-Conclusão e perspetivas futuras.....	61
Bibliografia.....	71
Anexos.....	63

Índice de Figuras:

Figura 3.1: - Reação geral de descarboxilação dos aminoácidos livres.....	5
Figura 3.2: Diagrama operativo do sistema de UHPLC.....	18
Figura 3.3: VITEK 2 Compact Instrument and Workstation	25
Figura 3.4: Cartas de identificação colorimétrica	26
Figura 4.1: Esquema sucinto da metodologia aplicada para pesquisa e contagem de microorganismos produtores de aminas biogénicas.....	35
Figura 4.2: Esquema ilustrativo do processo de espalhamento com ansa, início em 1 e término em 4.....	36
Figura 4.3: Esquema ilustrativo do processo de repicagem	36
Figura 5.1: Cromatograma onde são utilizadas as condições do ensaio 5 e o padrão 1,7-Diaminoheptano	41
Figura 5.2: Curva de calibração correspondente à amina histamina.....	43
Figura 5.3: Curva de calibração correspondente à amina cadaverina	43
Figura 5.4: Curva de calibração correspondente à amina putrescina	43
Figura 5.5: Curva de calibração correspondente à amina tiramina	44
Figura 5.6: Curva de calibração correspondente à amina triptamina	44
Figura 5.7: Curva de crescimento correspondente às amostras de camarão refrigerado a $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$	48
Figura 5.8: Curva de crescimento microbiológico referente à amostra de atum fresco AF1.....	50
Figura 5.9: Curva de crescimento microbiológico referente à amostra de atum fresco AF2.....	50
Figura 5.10: Curva de crescimento microbiológico referente à amostra de atum fresco AF3....	51
Figura 5.11: Relação entre a concentração de aminas biogénicas, em mg/kg, e a população microbiana presente no atum fresco 1.....	54
Figura 5.12: Relação entre a concentração de aminas biogénicas, em mg/kg, e a população microbiana presente no atum fresco 2.	54
Figura 5.13: Relação entre a concentração de aminas biogénicas, em mg/kg, e a população microbiana presente no atum fresco 3.....	55
Figura 5.14: Relação entre a concentração de aminas biogénicas, em mg/kg, e a população microbiana presente na amostra camarão de aquacultura.....	58

Implementação do método analítico para determinação de aminas biogénicas em amostras de pescado e produtos de pesca. Avaliação de processos para a sua formação

Índice de Tabelas

Tabela 3.1: Aminoácido precursor e respetiva amina correspondente após descarboxilação	5
Tabela 3.2: Classificação e estrutura das principais aminos biogénicas.....	8
Tabela 3.3: Toxicidade e respetivo grau de intensidade, associadas ao consumo de aminos .	11
Tabela 3.4: Fases estacionárias de cromatografia reversa	17
Tabela 4.1: Características e proveniência das amostras selecionadas na presente dissertação e respetiva sigla de denominação.....	28
Tabela 4.2: Condições da análise cromatográfica.....	28
Tabela 4.3: Condições aplicadas na eluição em gradiente	32
Tabela 5.1: Gradientes e fluxo	40
Tabela 5.2: Tempos de retenção dos ensaios analíticos preliminares	40
Tabela 5.3: Condições cromatográficas.....	41
Tabela 5.4: Tempo de retenção das aminos biogénicas, nas condições da tabela 9	41
Tabela 5.5: Concentração de cada amina nos pontos estipulados para a curva de calibração	42
Tabela 5.6: Critérios de aceitação da curva de calibração	45
Tabela 5.7: Concentração das aminos histamina, cadaverina e putrescina em amostras de atum fresco.....	46
Tabela 5.8: Concentração das aminos histamina, cadaverina e putrescina em amostras de atum em lata.....	47
Tabela 5.9: Bactérias identificadas na amostra de camarão de aquacultura	49
Tabela 5.10: Concentração das aminos histamina, cadaverina e putrescina em amostras de camarão de aquacultura.....	49
Tabela 5.11: Microrganismos identificados na amostra de atum fresco.....	52
Tabela 5.12: Microrganismos detetados nas amostras de atum em conserva C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8.	53
Tabela 7.1: Espécies bacterianas produtoras de aminos biogénicas.....	63

Implementação do método analítico para determinação de aminas biogénicas em amostras de pescado e produtos de pesca. Avaliação de processos para a sua formação

Lista de abreviaturas e siglas

ATP-	Adenosina Trifosfato
APT-	Água Peptonada Tamponada
AQC-	6-Aminoquinolil-N-Hidroxisuccinimidil Carbamato, do inglês <i>6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate</i>
BPL-	Boas Práticas de Laboratório
C ₁₈ -	Octadecil
CE-	Comunidade Europeia
CH ₄ O ₃ S-	Ácido Metanosulfónico, do inglês <i>Methanesulfonic Acid</i>
CNBF-	4-Cloro-3,5-Dinitrobenzotrifluoreto, do inglês <i>4-Chloro-3,5-Dinitrobenzotrifluoride</i>
COS-	<i>Columbia Agar</i>
DAO-	Diamina Oxidase
DAH-	1,7-Diaminoheptano, do inglês <i>1,7-Diaminoheptane</i>
DNA-	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Desoxiribonucleic Acid</i>
ELISA-	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EU-	União Europeia, do inglês <i>European Union</i>
FDA-	Administração para a Alimentação e Medicamentos dos Estados Unidos da América, do inglês <i>Food Drugs Administration</i>
GC-	Cromatografia Gasosa, do inglês <i>Gas chromatography</i>
HCl-	Ácido Clorídrico, do inglês <i>Hydrochloric Acid</i>
HClO ₄ -	Ácido Perclórico, do inglês <i>Perchloric Acid</i>
HPLC-	Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência, inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
IQQ-	Índice de Qualidade Química
IEC-	Comissão Electrónica Internacional
ISO-	Organização Internacional para a Estandardização, do inglês <i>Internal Standard Organization</i>
IAB-	Índice de Aminas Biogénicas
LD-	Limite de Detecção
LQ-	Limite de Quantificação
MAO-	Monoamina Oxidase
NaCl-	Cloreto de Sódio, do inglês <i>Sodium Chloride</i>
NaOH-	Hidróxido de Sódio, do inglês <i>Sodium Hydroxide</i>
NQS-	1,2-Naftoquinona-4-Sulfonato, do inglês <i>1,2-Naphthoquinone-4-Sulfonic</i>
OCDE-	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
OPA-	O-Ftalaldeído, do inglês <i>O-Phthalaldehyde</i>
PAD-	Detetor de Fotodiodo, do inglês <i>Photodiode Array Detector</i>
PCA-	<i>Plate Count Agar</i>
PCR-	Reação em Cadeia da Polymerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>

RNA- Ácido Ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*

RP-HPLC- Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência em Fase Reversa, do inglês *Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography*

TCA- Ácido Tricloroacético, do inglês *Trichloroacetic Acid*

TLC- Cromatografia em Camada Fina, do inglês *Thin Layer Chromatography*

TS- Triptona Sal

TSA-Triptose Soja Agar

UHPLC- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, do inglês *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*

UV-Vis- Ultravioleta-Visível

VRBG- *Violet Red Bile Glucose*

Implementação do método analítico para determinação de aminas biogénicas em amostras de pescado e produtos de pesca. Avaliação de processos para a sua formação

1.- Objetivos e enquadramento do tema

1.1-Objetivos

A presente dissertação traduz-se na implementação de um método analítico para a determinação simultânea de aminas biogénicas em amostras de pescado e produtos de pesca, nomeadamente atum fresco, atum em conserva e camarão congelado.

Os principais objetivos deste estudo foram:

- Tomar contacto com a metodologia analítica de cromatografia líquida.
- Desenvolvimento da metodologia por cromatografia líquida para a determinação simultânea das aminas biogénicas Histamina, Putrescina, Cadaverina, Triptamina e Tiramina com recurso ao uso de padrões.
- Desenvolvimento de um método para a extração das aminas da matriz alimentar
- Avaliação do desenvolvimento bacteriológico e identificação das espécies produtoras de aminas numa determinada condição de conservação.
- Avaliação da relação entre a concentração de aminas determinada e os microrganismos presentes na matriz alimentar.

1.2-Enquadramento do tema

Devido à localização geográfica de Portugal, um país costeiro rodeado pelo oceano Atlântico, o consumo de pescado e seus derivados por parte da população é frequente e bastante apreciado. Portugal afigura-se como sendo o maior consumidor de peixe fresco da Europa apresentando o maior consumo de produtos de pesca *per capita*, mais de 53,8 kg/ano (FAO 2015).

Uma das formas mais comum de contaminação do pescado é a produção de metabolitos biologicamente ativos, através da degradação da proteína do músculo do peixe por parte da flora microbiana presente. Destes metabolitos, designados vulgarmente de aminas biogénicas, a histamina é aquele que é alvo de controlo legislativo uma vez que é a forma de toxicidade mais frequente que advém da ingestão de peixe.

Em Portugal no ano 2012, foram divulgadas 12 notificações relativas a produtos de atividade piscatória provenientes da União Europeia (EU), nomeadamente de países como Espanha, Itália e Holanda, verificando-se um total de 149 indivíduos com sintomas comumente associados a intoxicação por histamina (ASAE 2012). Ainda em 2017 foram confirmados 154 casos de intoxicação por consumo de atum adulterado proveniente de Espanha. A utilização de substâncias químicas ou naturais, que possuem a capacidade de prolongar ou simular a cor vermelha do atum, fazem o peixe aparentar frescura por mais tempo. Contudo a quantidade de microrganismos e metabolitos biologicamente ativos pode ser bastante elevada, apesar da boa aparência do pescado (Jornal de Notícias 2017).

A contaminação dos produtos alimentares advém sobretudo das práticas incorretas de transporte, processamento e armazenamento. Contudo, apesar de a temperaturas inferiores a 5°C a flora bacteriana produzir quantidades residuais ou quase nulas de amins biogénicas é de notar que estes compostos aminados são termoestáveis, significando que, a quantidade de amins produzida entre o tempo da captura e o tempo de refrigeração, perdura no alimento não sendo eliminada. Deste modo é imposto pela EU, Regulamento nº 2073, um limite máximo aceitável de histamina para o pescado e seus derivados de 200 mg/kg, sendo necessário verificar frequentemente o cumprimento deste limite (Comissão Europeia 2007).

Em suma, torna-se cada vez mais importante desenvolver métodos, metodologias e sistemas de controlo para garantir a segurança e qualidade dos produtos que consumimos, quer estes sejam frescos, quer estes sejam submetidos a condições de conserva como a salga, a fumagem ou a secagem. Metodologias como a cromatografia líquida de ultra *performance* permitem quantificar em simultâneo as amins biogénicas frequentemente associadas à degradação proteica da matéria-prima, como a histamina, a cadaverina, a putrescina, a tiramina e a triptamina, em apenas um único ensaio e com acurácia elevada.

Salienta-se assim a importância desta dissertação para o desenvolvimento e implementação destas novas técnicas e metodologias de trabalho.

1.3-Organização estrutural

No capítulo 1 encontram-se mencionados os objetivos do estudo assim como toda a estrutura escrita.

No capítulo 2 está caracterizado o instituto onde foi desenvolvida toda a componente laboratorial necessária ao estudo.

No capítulo 3 encontra-se informação essencial para a correta contextualização e compreensão do trabalho desenvolvido neste documento. Neste capítulo é mencionada informação acerca dos metabolitos em estudo e acerca das técnicas de quantificação utilizadas atualmente para quantificar estes mesmos compostos. Também é possível encontrar neste capítulo informação relacionada com os principais microrganismos responsáveis pela produção das amins biogénicas assim como as técnicas e equipamentos utilizados para determinar esses mesmos microrganismos.

No capítulo 4 está descrito todo o procedimento científico e todo o equipamento utilizado quer no decorrer da análise química, quer no decorrer na análise microbiológica.

No capítulo 5 são apresentados os resultados obtidos, quer para quantificação e determinação das amins biogénicas, quer para a contagem e identificação dos microrganismos presentes. Em simultâneo, também neste capítulo, são discutidos os mesmos.

No capítulo 6 encontra-se a conclusão da dissertação, assim como as perspetivas futuras que advém do trabalho concluído.

2- Caracterização do instituto

O instituto nacional Ricardo Jorge caracteriza-se como sendo uma instituição pública administrada indiretamente pelo Estado Português ao encargo do ministério da saúde, possuindo autonomia científica, técnica, administrativa, financeira e património próprio (INSA 2018).

A sua fundação em Lisboa data de 1939, apesar de anteriormente em 1858 ter sido fundado no Porto, pelo médico Ricardo Jorge. Este órgão público funciona como laboratório do Estado no sector da saúde, laboratório nacional de referência e observatório nacional de saúde, organizando-se internamente em seis grandes departamentos:

- Departamento da Alimentação e Nutrição;
- Departamento de Doenças Infeciosas;
- Departamento de Epidemiologia;
- Departamento de Genética Humana;
- Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção das Doenças Não Transmissíveis;
- Departamento de Saúde Ambiental.

Disponibilizando ainda unidades operativas quer em Lisboa, quer na grande área da metrópole de Lisboa, e no Porto (INSA 2018).

Departamento de Alimentação e Nutrição

Através do departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) é assegurado o desenvolvimento de trabalhos no âmbito da segurança alimentar, toxicologia, avaliação de riscos, composição de alimentos, entre outros. Como laboratório de referência, é ainda atribuída a este departamento a função de implementar novas metodologias, de efetuar estudos epidemiológicos laboratoriais de doenças que provenham da alimentação, de prestar serviços diferenciados como ensaios analíticos, produção de materiais de referência e organização de programas de avaliação externa da qualidade laboratorial (INSA 2018).

Implementação do método analítico para determinação de aminas biogénicas em amostras de pescado e produtos de pesca. Avaliação de processos para a sua formação

3- Revisão Bibliográfica

3.1- Aminas biogénicas: Origem e classificação

As aminas biogénicas são metabolitos nitrogenados, de baixo peso molecular, que podem ser produzidos através da descarboxilação de aminoácidos livres ou através da transaminação de aldeídos e cetonas, devido à ação do metabolismo microbiano, Tabela 3.1. (Bilgin and Gençcelep 2015).

A reação de descarboxilação envolve a remoção enzimática do grupo α -carboxilo, com libertação de dióxido de carbono e sequente formação da amina biogénica, Figura 3.1.

A ocorrência deste fenómeno pode ser mediada através de duas vias biossintéticas, a via endógena, quando se trata de enzimas endógenas presentes naturalmente nos alimentos, e a via exógena, quando se trata de enzimas descarboxilases exógenas produzidas pela flora microbiana (Rodriguez *et al.* 2014).

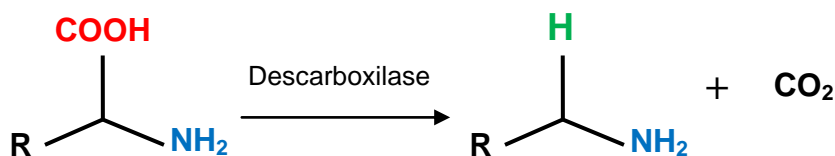


Figura 3.1- Reação geral de descarboxilação dos aminoácidos livres

Tabela 3.1: Aminoácido precursor e respetiva amina correspondente após descarboxilação (Anderson 2008)

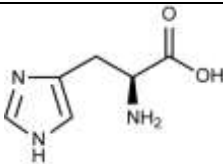
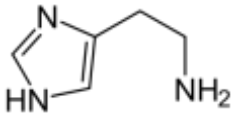
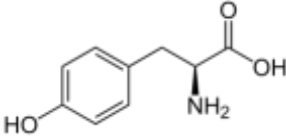
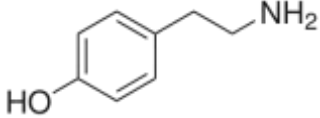
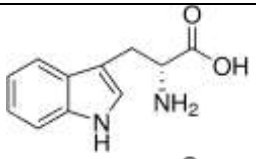
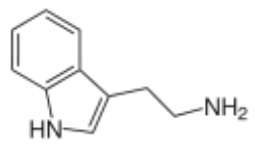
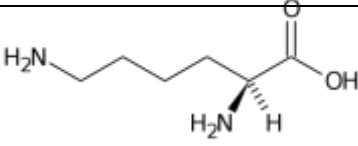

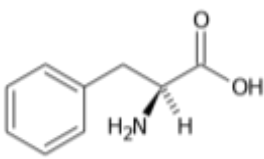
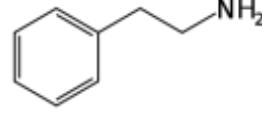
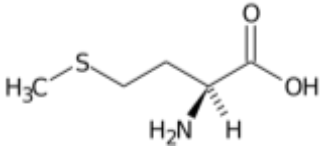
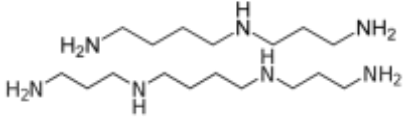
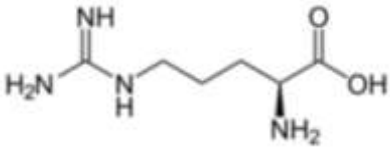
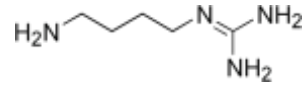
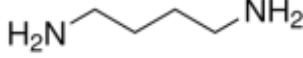
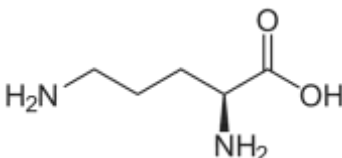
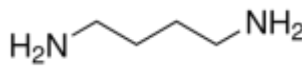
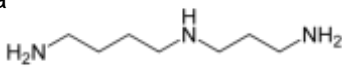
Aminoácidos Precursores	Aminas Biogénicas
Histidina 	Histamina 
Tirosina 	Tiramina 

Tabela 3.1: Aminoácido precursor e respetiva amina correspondente após descarboxilação (Anderson 2008) (continuação)

<p>Triptofano</p> 	<p>Triptamina</p> 
<p>Lisina</p> 	<p>Cadaverina</p> 
<p>Fenilalamina</p> 	<p>Feniletilamina</p> 
<p>Metionina</p> 	<p>Espermidina</p>  <p>Espermina</p>
<p>Arginina</p> 	<p>Agmatina</p>  <p>Putrescina</p> 
<p>Ornitina</p> 	<p>Putrescina</p>  <p>Espermidina</p> 

Nas células eucariotas, a síntese destes compostos aaminados é essencial, uma vez que atuam como precursores da biogénese de hormonas, alcaloides, ácidos nucleicos e proteínas. A produção endógena de amins como a epinefrina, dopamina e seratonina, resulta de situações relacionadas com stress, cansaço, nervosismo e ainda hipoglicémia e jejum prolongado (Premont *et al.* 2001). Em paralelo, as amins biogénicas, como a putrescina e a espermina, são críticas na modulação do ácido desoxirribonucleico (DNA), do ácido ribonucleico (RNA) e na síntese proteica, enquanto que as amins como a histamina são indispensáveis para o correto funcionamento dos neurotransmissores (Igarashi *et al.* 2001). Contudo, nas células procarióticas, pensa-se que as amins sejam formadas em resposta à

acidificação do meio, funcionando como mecanismo de defesa às condições adversas de pH (Lee *et al.* 2007). A descarboxilação aumenta a vitalidade das células bacterianas através do consumo de prótons e da excreção simultânea de aminas e dióxido de carbono, verificando-se o restabelecimento do pH do ambiente envolvente.

Segundo Molenaar e colaboradores, 1993, a produção de aminas biogénicas é também uma forma de obtenção de energia, podendo revelar-se necessária a microrganismos, como as bactérias ácido lácticas, que não possuem cadeia respiratória para gerar quantidades elevadas de adenosina trifosfato (ATP). Deste modo, através do antiporte energético aminoácido/amina, pode ser gerada uma força motriz de prótons que liberta energia passível de ser utilizada pela célula, quer no transporte de nutrientes, quer na produção de ATP por meio da enzima ATP sintase.

Ainda assim, a produção de aminas biogénicas pode também mediar processos fisiológicos nas bactérias como a resposta ao stress osmótico e ao stress oxidativo (Schiller *et al.* 2000).

As aminas biogénicas como a histamina, cadaverina, putrescina, tiramina, triptamina, espermina e espermidina estão frequentemente presentes em produtos fermentados, como o queijo, o vinho e a cerveja, contudo, alimentos como peixe, carne, lacticínios e vegetais também apresentam uma probabilidade elevada de conter aminas biogénicas (Linares *et al.* 2011).

Apesar de desempenharem funções vitais nos seres vivos, estes compostos podem também desencadear efeitos tóxicos, sendo estes evidenciados apenas quando a concentração é muito elevada (ingestão de alimento com concentração elevada destes metabolitos) ou quando os mecanismos naturais de degradação das aminas são inibidos ou geneticamente deficientes. Consoante o seu modo de atuação nos sistemas vivos, as aminas podem ser designadas de psicoativas ou vasoativas (Faria 2011).

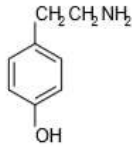
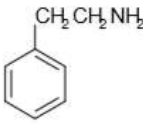
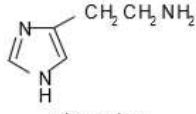
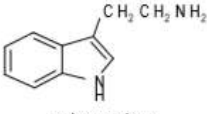

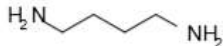
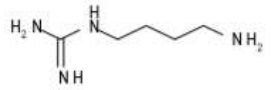
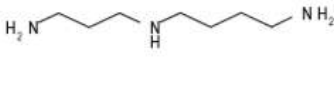

As aminas classificadas de psicoativas atuam nos transmissores nervosos do sistema nervoso central, já as aminas vasoativas atuam direta ou indiretamente sobre o sistema vascular. A histamina, a putrescina e a cadaverina são exemplos de aminas psicoativas, porém a tiramina e a triptamina são exemplos de aminas vasoativas (Cardozo *et al.* 2013).

Todavia, a quantidade e o tipo de amina formada são influenciados essencialmente pelas condições de armazenamento (Komprda *et al.* 2001), processos e práticas de produção, proporção da população microbiana com atividade descarboxilase, qualidade e constituição do alimento e pela disponibilidade de aminoácidos livres (Rivas *et al.* 2008). No enquadramento da segurança alimentar, é necessário que os produtos alimentares sejam produzidos, transportados e armazenados sob escrupulosas condições higiénicas, sendo fundamental considerar todos os parâmetros que podem promover o crescimento microbiano, como a temperatura, o pH, a humidade e a atmosfera envolvente, com vista a minimizar a produção de aminas (Křížek *et al.* 2004).

Estes compostos nitrogenados podem ainda ser classificados de diferentes formas, atendendo à sua estrutura química, podendo ser designados de alifáticos (putrescina e

cadaverina), aromáticos (tiramina) ou heterocíclicos (histamina e triptamina), contudo, considerando o número de grupos amina, também podem ser classificados de monoamina (tiramina), (Yeragani and Sathyanarayana 2009) diaminas (putrescina e cadaverina), (Izquierdo *et al.* 2018), ou poliaminas (espermina e espermidina), Tabela 3.2, (Assis *et al.* 2015).

Tabela 3.2: Classificação e estrutura das principais amins biogénicas, Gouveia 2013

Monoaminas aromáticas		
	Tiramina	2-Feniletilamina
Aminas heterocíclicas		
	Histamina	Triptamina
Diaminas alifáticas		
	Cadaverina	Putrescina
Poliaminas alifáticas		
	Agmatina	Espermidina
		
	Espermina	

3.2- Aminas Biogénicas: Alimentos

Diversos estudos indicam que o consumo de alimentos crus ou insuficientemente confeccionados é uma das principais causas das intoxicações alimentares, uma vez que a presença dos metabolitos aminados é consequência da contaminação microbiana inicial dos alimentos (ASAE 2012).

A descarboxilação de aminoácidos livres e a transaminação de aldeídos e cetonas provenientes da ação microbiana, são consequências de má manipulação, higienização do local de produção, confeção e/ou armazenamento do produto alimentar (ASAE 2012).

Contudo, existem alimentos que devido à sua constituição em macronutrientes e micronutrientes, assim como devido ao seu processo de fabrico, são mais suscetíveis à contaminação microbiológica e consequente produção de compostos amina, como é o caso do vinho, do queijo, do peixe, dos produtos cárneos fermentados e dos vegetais (Gomes *et al.* 2014)

As bactérias encontram nos alimentos fermentados uma fonte de aminoácidos livres.

No vinho, a concentração de aminas biogénicas é relativamente baixa aquando do fim da fermentação alcoólica (Polo *et al.* 2011). Não obstante, o álcool também desempenha um papel crítico quanto à presença de compostos aminados nos produtos que sofrem fermentação alcoólica, pois é um potenciador da atividade tóxica das aminas (Gouveia 2013), sendo responsável pela inibição da ação enzimática da enzima monoamina oxidase (MAO) que tem como principal função a degradação de monoaminas, como a tiramina (Fernández *et al.* 2007).

Os lacticínios, como o queijo, são outros produtos alimentares que também possuem uma suscetibilidade elevada para o desenvolvimento de aminas biogénicas (Preedy *et al.* 2013). O processo de produção da grande maioria dos queijos inclui uma etapa de maturação na qual ocorre a degradação proteica, permitindo uma acumulação elevada de aminoácidos livres que podem ser biotransformados em aminas biogénicas pela ação da enzima descarboxilase (Innocente and D'Agostin 2002). Geralmente, a microflora presente no interior do queijo corresponde a bactérias ácido lácticas enquanto que no exterior podem frequentemente ser detetadas bactérias Gram negativas e leveduras (Abriouel *et al.* 2008).

As aminas tiramina e putrescina são encontradas, geralmente, durante a fase de maturação, sendo a histamina e a cadaverina mais predominantes no final dessa fase (Rodríguez *et al.* 2004; Valsamaki *et al.* 2000).

Os alimentos de origem animal são naturalmente ricos em aminoácidos. Na carne e no peixe o teor de compostos biossintetizados, como as aminas biogénicas, aumenta no postmortem, em consequência da elevada quantidade de enzimas proteolíticas que são libertadas e devido ao rápido processo autolítico (Gouveia 2009).

Os peixes da família *Scombridae* como o atum, o bonito e a cavala, são aqueles que apresentam maiores concentrações de histamina, uma vez que possuem maiores teores de histidina livre no músculo (Hwang *et al.* 2011). Consequentemente, nesta família, têm sido efetuados vários estudos referentes às concentrações deste metabolito tóxico no musculo do peixe, assim como às estirpes bacterianas produtoras de histidina descarboxilase, concluindo-se que *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Pantoea agglomerans* e *Enterobacter cloacae* (Kim *et al.* 2001) são frequentemente as bactérias mais encontradas.

Em contrapartida, em peixes não pertencentes à família *Scombridae*, mas cujos níveis de histidina livre presente no músculo também são elevados, não foi possível estabelecer uma relação de associação entre a histamina produzida e as espécies bacterianas específicas responsáveis pela produção da amina biogénica (Maia 2015).

A ocorrência de reações de oxidação e hidrólise pode proporcionar o aumento da formação de compostos voláteis, como amoníaco, e compostos não voláteis, como as aminas biogénicas (Monteiro *et al.* 2012).

Os produtos cárneos fermentados são produzidos através da adição de microrganismos que produzem enzimas, amílases, protéases e lipases, responsáveis pela hidrólise de polissacáridos, proteínas e lipídios, respetivamente, resultando numa melhoria do sabor, do aroma e da textura do produto final (Suzzi and Gardini 2003).

No entanto, os microrganismos adicionados também podem produzir substâncias indesejáveis como, por exemplo, as aminas biogénicas (Suzzi and Gardini 2003).

A concentração elevada de proteínas presente nestes produtos e a atividade proteolítica durante a fase de maturação, promovem a ação da enzima descarboxilase das culturas adicionadas no processo produtivo, como de outros microrganismos que podem vir a contaminar o produto ao longo das várias etapas de produção (Gouveia 2013).

A amina que se encontra frequentemente associada aos produtos cárneos fermentados é a tiramina, possuindo também concentrações mais elevadas que as restantes aminas, porém a putrescina, a cadaverina e a triptamina também já foram detetadas em carnes fermentadas (Ivanov *et al.* 2015).

Por último, os vegetais também se evidenciam propícios ao desenvolvimento de aminas biogénicas, tendo estas sido encontradas em quantidades elevadas nas crucíferas, como os brócolos e a couve-flor (Martínez *et al.* 2008). Em alguns vegetais, o processo de cozedura promove a transferência dos compostos aminados para a água utilizada no cozimento, contudo, e de novo nas crucíferas, este processamento apenas reduz o teor de aminas, não possibilitando a sua eliminação total (Ladero *et al.* 2011).

O estudo desenvolvido por Tapingkae *et al.* em 2010 demonstrou que as aminas biogénicas são termoestáveis resistindo a períodos de exposição prolongada ao calor. A eliminação destas toxinas revela-se ineficiente através de processos de confeção, sendo a putrescina e a espermina as aminas encontradas com mais frequência nos vegetais, após cozedura.

O efeito tóxico das aminas biogénicas não está relacionado apenas com a concentração destas toxinas nas matrizes alimentares, mas também com os mecanismos de destoxificação de cada indivíduo (Ladero *et al.* 2011).

3.3- Aminas Biogénicas: Toxicidade

As aminas biogénicas, geralmente, não representam um risco para a saúde dos consumidores, contudo, quando são ingeridas em quantidades elevadas ou quando os mecanismos naturais de catabolismo de uma ou mais aminas são inibidos ou geneticamente deficientes, podem provocar intoxicações alimentares graves, Tabela 3.3. Ainda assim, a ingestão de álcool, a presença de outras aminas não voláteis ou as doenças gastrointestinais podem ser fatores potenciadores da ação destes compostos aminados, aumentando a suscetibilidade dos indivíduos à ocorrência de intoxicação alimentar (Gouveia 2009).

Não obstante, nos intestinos humanos, uma baixa concentração de aminas biogénicas é metabolizada naturalmente, sendo produzidos subprodutos menos tóxicos e menos ativos. Este mecanismo de destoxificação engloba enzimas específicas como a diamina oxidase (DAO) e a monoamina oxidase, já supra referida no capítulo anterior, contudo, quando são ingeridas grandes quantidades de aminas, o sistema de destoxificação não é suficientemente eficaz na sua eliminação (Cardozo *et al.* 2013). Existem fatores intrínsecos a cada indivíduo, como a predisposição genética, doenças gastrointestinais ou até a inibição da atividade da

enzima DAO, devido à toma de medicamentos ou ingestão de álcool, que podem resultar na ineficiência destes mecanismos de destoxificação. As aminas consideradas mais tóxicas para o Homem são a histamina e a tiramina (Cardozo *et al.* 2013).

A intoxicação por histamina, frequentemente designada de *fish poisoning*, está muitas vezes associada ao consumo de peixes da família *Scombridae*, (Chen *et al.* 2010) onde estão incluídos peixes como o atum e a cavala. No entanto, em famílias como *Clupeidae* e *Pomatomidae*, às quais pertencem a sardinha e as anchovas respetivamente, também podemos encontrar regularmente histamina. O período de incubação deste metabolito pode variar de minutos a horas, após a ingestão, podendo manifestar-se através de sintomas como dores de cabeça, vasodilatação e consequente hipotensão, problemas de pele (rubor e comichão), problemas gastrointestinais (diarreia, cólicas, vómitos) e problemas neurológicos (dores de cabeça, tonturas)(Souza *et al.* 2015).

Também a tiramina pode provocar intoxicações graves, provocando crises de hipertensão, geralmente acompanhadas por enxaquecas. Os sintomas, por vezes, podem evoluir e conduzir à formação de hemorragias intracranianas, à ocorrência de falha cardíaca e eventualmente podem surgir edemas pulmonares (Alencar *et al.* 2011; Gomes *et al.* 2014)

A ação destas duas aminas, tiramina e histamina, pode ser potenciada pela presença de outras aminas biogénicas, como a putrescina e a cadaverina, que possuem a capacidade de inibir enzimas responsáveis pela oxidação da histamina e da tiramina (Montanha 2016).

O envenenamento através de histamina ocorre após o consumo de alimentos que contenham uma concentração desta amina superior a 500 ppm (Gonzaga *et al.* 2009)

Contudo, na presença de putrescina e cadaverina, a histamina pode ser tóxica em concentrações inferiores a 500 ppm (Emborg and Dalgaard 2006).

As aminas putrescina, tiramina e cadaverina apresentam toxicidade quando consumidas em concentrações superiores a 2000 ppm, ao contrário da espermina e da espermidina que possuem efeito tóxico a partir de concentrações superiores a 600 ppm (Prester 2011; Gouveia 2009), visto que estas últimas podem reagir com nitritos, formando nitrosaminas carcinogénicas que constituem um risco para a saúde humana.

Tabela 3.3: Toxicidade e respetivo grau de intensidade, associadas ao consumo de aminas biogénicas (Marinét *et al.* 1995).

	Enxaqueca	Formação de nitrosaminas	Outros efeitos
Histamina	++	+	- Intoxicação Histamínica (Fish Poisoning) -Toxicidade Hepática
Tiramina	+++	+	Neurológicos / Cardíacos
β-Feniletilamina	++	+	Neurológicos
Serotonina	-	+	Gástricos /Cardíacos
Triptamina	-	+	Cardíacos
Putrescina	-	+	-

Tabela 3.3: Toxicidade e respetivo grau de intensidade, associadas ao consumo de aminas biogénicas (Marinét et al. 1995) (continuação).

	Enxaquecas	Formação de nitrosaminas	Outros efeitos
Cadaverina	-	+	-
Espermidina	-	+	-
Espermina	-	+	-
Agmatina	-	+	-

3.4-Aminas Biogénicas: Legislação

Atualmente, a legislação em vigor, Regulamento (CE) N.º 2073/2005e consequentes atualizações, estabelece um limite máximo para a concentração de histamina apenas para produtos provenientes da pesca. Deste modo, encontra-se definido no ponto 1.26 no Anexo 1 do regulamento supracitado, o valor máximo de 200 mg/kg para peixes associados a um teor de histidina elevado e no ponto 1.27 definido 400 mg/kg para peixes associados a um teor de histidina também elevado mas que são submetidos a um tratamento de Salmoura .

A histamina é a única amina biogénica submetida a regulamentação europeia, não existindo qualquer referência aos restantes compostos aminados nem a outras matrizes alimentares como as carnes fermentadas, os queijos ou os vinhos.

Por conseguinte, podem ser recolhidas amostras ao nível do comércio a retalho, não sendo possível aplicar a norma estabelecida no artigo 14.º do Regulamento (CE) N.º. 178/2002 ao abrigo da qual se deve partir do princípio de que, se existir um produto do lote inadequado para consumo, todos os produtos desse lote serão inadequados (Parlamento Europeu e do Conselho 2002).

3.5- Índice de qualidade

Atualmente, a formação de aminas biogénicas tem sido considerada um indicador de deterioração microbiológica em produtos alimentares (Spano *et al.* 2010). O estudo Luiz e Silva de comprova que é possível relacionar o odor com a concentração de aminas presentes nas matrizes de consumo alimentar, revelando que soluções aquosas de putrescina e cadaverina conferem um odor típico e perceptível em concentrações de 22 e 190 ppm, respetivamente . Em conformidade, na mesma publicação, é estabelecida uma relação matemática entre a concentração de aminas e o estado de deterioração do pescado designada de índice de qualidade química (IQQ) ou índice de aminas biogénicas (IAB).

Deste modo o IAB em pescado é calculado através da seguinte equação:

$$IAB = \frac{Histamina + Putrescina + Cadaverina}{1 + Espermidina + Espermina}$$

Durante o processo de deterioração alimentar, ocorre gradualmente um aumento da produção de histamina, cadaverina e putrescina enquanto, simultaneamente, se verifica também uma diminuição das aminas espermina e espermidina. O índice de qualidade é representativo das condições de higiene dos alimentos e dos processos produtivos a que estes foram sujeitos. No pescado, se $IAB < 1$ considera-se o produto de boa qualidade microbiológica, no entanto, se $IAB > 1$ o pescado é considerado de má qualidade, sendo impróprio para consumo (Luiz and Silva 2014).

Este indicador de qualidade pode ser aplicado a outros produtos alimentares como a cerveja, contudo, é necessário considerar aminas como a tiramina, a triptamina, a β -fenilalanina e a agmatina que são frequentemente encontradas em produtos fermentados (Luiz and Silva 2014).

$$IAB = \frac{Histamina + Putrescina + Cadaverina + Tiramina + Triptamina + Fenilalanina}{1 + Agmatina}$$

Para cada matriz alimentar é possível definir um índice de qualidade de aminas biogénicas, sendo importante considerar a natureza do alimento, as condições e os processos industriais a que este foi submetido, considerando também a preferência do microbiota pelas matrizes (Özogul *et al.* 2018)

3.6- Metodologias analíticas para a deteção e quantificação de aminas biogénicas

As aminas biogénicas são compostos interessantes na perspetiva da segurança alimentar, não só pela sua toxicidade mas também pela capacidade de se traduzirem num bom indicador de degradação alimentar. Por este motivo, é importante monitorizar a quantidade destes compostos nitrogenados nos alimentos disponibilizados para consumo.

A deteção e a quantificação de aminas biogénicas nos alimentos pode ser efetuada através de inúmeras técnicas que têm vindo a ser desenvolvidas, nomeadamente: cromatografia de fase gasosa (GC), cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e ensaios bioquímicos como o teste, *enzyme-linked immunosorbent assay*, (ELISA) (Önal 2007).

Contudo, a cromatografia líquida de fase reversa é o método mais empregue na literatura científica para a determinação das aminas biogénicas, não só devido às propriedades físicas e químicas das mesmas, mas também em consequência do desenvolvimento da técnica *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e do *Ultra-Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) (Nuñez and Medina 2002).

A cromatografia em camada fina apesar de ser simples requer um tempo excessivo de análise o que pode conduzir a resultados imprecisos e pouco fiáveis. Ainda assim, Carrascosa e Garci consideram que a técnica de TLC é bastante satisfatória quando os

pré-requisitos assentam num método simples, rápido e barato, como demonstraram estes autores ao determinar a capacidade de produção de aminas biogénicas, por parte de bactérias, em meios de cultura líquida que contêm os aminoácidos precursores correspondentes de cada amina (Carrascosa and Garci 2005).

Por outro lado, a cromatografia gasosa quando associada a um detetor de espectroscopia de massa, constitui uma alternativa bastante equiparada à cromatografia líquida de alta eficiência. Contudo, uma vez que as aminas não são compostos naturalmente voláteis é necessário submete-las a um processo de acilação, mediado pela adição de um agente derivatizante (Fernandes *et al.* 2001).

Em estudos como o de Fernandes *et al.* (2001) é possível constatar que certos derivatizados de aminas são difíceis de volatilizar, como é o caso das aminas tiramina e histamina, mais notório nos derivatizados de histamina, que nem sempre adquirem capacidade de volatilização após acilação, tornando-se por este motivo, a técnica de cromatografia líquida mais usual para a determinação das aminas.

Os métodos de HPLC e UHPLC revelam mais acurácia, sensibilidade e repetibilidade de resultados comparativamente aos restantes métodos mencionados revelando-se os mais consensuais na literatura científica, referente à determinação de aminas biogénicas em matrizes alimentares (Nuñez and Medina, 2002).

Os detetores utilizados frequentemente nestes sistemas cromatográficos são os UV-Vis, detetor de radiação ultravioleta-visível, ou, Photodiode Array Detector, PAD. Nos ensaios com aminas biogénicas é frequentemente utilizado o detetor PAD, uma vez que, permite adquirir em simultâneo cromatogramas de diferentes compostos com diferentes comprimentos de onda (Manetta *et al.* 2016).

Contudo, o sucesso da determinação cromatográfica das aminas através das técnicas de cromatografia líquida de elevada e ultra pressão, está inerente a dois processos determinantes, a extração e a derivatização das aminas (Nuñez and Medina, 2002).

A extração das aminas em matrizes alimentares sólidas é obtida por hidrólise ácida, referindo-se frequentemente, o ácido clorídrico (HCl), o ácido perclórico (HClO₄), o ácido tricloroacético (C₂HCl₃O₂) e o ácido metanosulfónico (CH₃SO₃H), ainda assim também podem ser utilizados solventes orgânicos como o metanol e o acetonitrilo. Este procedimento pode ser influenciado por inúmeros aspetos como o tipo de ácido ou de solvente orgânico utilizado, teor de sal utilizado para saturar a amostra, pH e tempo e tipo de agitação que é infligido no decorrer do processo (Hernández and Saurina 2011). Alguns autores como compararam a capacidade de extração de vários ácidos em diferentes aminas, não conseguindo obter resultados idênticos nas experiências (Moret and Conte 1996). Na escolha do ácido extrator deve ser tida em consideração o tipo de matriz que se pretende estudar e não a amina que se pretende determinar. Em continuação, estes mesmos autores relatam que o ácido clorídrico com uma concentração de 0,1 M é uma boa opção para extrair aminas em queijos mas em matrizes como carne e peixe o ácido tricloroacético a 5% (m/v) permite melhores extrações.

No estudo desenvolvido por Custódio e colaboradores em 2007, foi também comparado o poder extrativo de diferentes ácidos, sendo concluído que com HCL 0,1 M é mais simples e rápido extrair adequadamente as aminas biogénicas em queijos. Procedendo à extração é imprescindível efetuar a derivatização do extrato, uma vez que as aminas biogénicas não possuem grupos cromóforos na sua estrutura (Custódio and Tavares 2007).

Os grupos cromóforos são descritos como grupos funcionais que possuem a capacidade de absorver energia na região espectral do ultravioleta e do visível, a reação da amina biogénica com o agente derivatizante promove a formação de um subproduto com capacidade de absorver e emitir energia sob a forma de radiação. Os reagentes utilizados frequentemente como agentes derivatizantes são o 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoreto (CNBF), 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS), 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC), o-ftalaldeído (OPA) e o cloreto de dansilo, sendo este último o composto utilizado preferencialmente, uma vez que não derivatiza apenas aminas primárias como também derivatiza aminas secundárias, originando derivatizados estáveis e passíveis de deteção (Hernández and Saurina 2011).

Ainda assim, além dos métodos analíticos descritos, metodologias de imunoensaios como o teste ELISA, comercializadas em kits, estão a ser utilizados cada vez mais devido à rapidez e sensibilidade alcançada. O kit ELISA é comercializado maioritariamente para controlo rotineiro de Histamina e Tiramina (Pinheiro 2015), triando estas aminas sem a necessidade de recorrer a metodologias mais dispendiosas. A utilização deste método na determinação de histamina em atum fresco e processado já foi efetuada inúmeras vezes, contudo, para teores de histamina elevados, esta técnica perde a viabilidade uma vez que muitos dos kits possuem limites de quantificação máximo de 50 mg/kg (EFSA 2011).

Apesar das variadas metodologias desenvolvidas até à atualidade, a cromatografia líquida é a única que permite a deteção e a quantificação de todas as aminas biogénicas em simultâneo (EFSA 2011).

3.6- Cromatografia Líquida: Fundamentos e princípios teóricos

Os primórdios da cromatografia líquida moderna datam de 1903, quando o biólogo russo Mikhail Semenovich Tswett separou pela primeira vez pigmentos provenientes de plantas. Os pigmentos foram adsorvidos em papel de filtro e separados com uma mistura de álcool e éter de petróleo (Toldrá and Nollet 2013).

O desenvolvimento da primeira coluna cromatográfica deve-se também a Tswett que objetivou uma maior eficiência e robustez nas separações, no entanto a designação cromatografia surgiu três anos depois em 1906, atribuída também por Mikhail Tswett, e resulta da aliteração do termo “cromo” proveniente do grego “chroma”, que significa cor, com o termo “grafia” que provém também do grego “graphe” que significa escrever. No ano de 1958 foi concebido o primeiro cromatógrafo líquido projetado por Stanford Moore e William H. Stein com o intuito de analisar aminoácidos (Pacheco *et al.* 2015).

Em suma, esta técnica fundamenta-se na separação de componentes presentes numa dada mistura, consoante a afinidade que estes possuem para a fase móvel e para a fase estacionária. Os compostos a separar e a fase móvel, que pode ser gasosa, líquida ou ambas (fluido super crítico) atravessam a fase estacionária que possui por sua vez partículas porosas ou solventes imiscíveis com capacidade de reter componentes que possuam maior afinidade. A este processo designamos de eluição (Porto,2014).

A partir de 1903, a cromatografia foi alvo de inúmeros estudos teóricos e tecnológicos que foram colmatar na obtenção de metodologias com capacidade de excelente separação de analitos, com alta resolução, com elevada eficiência e sensibilidade como a técnica de *High performance liquid chromatography* (HPLC) e de *ultra performance liquid chromatography* (UHPLC) (Toldrá and Nollet 2013).

A técnica de HPLC é caracterizada pela utilização de colunas de aço inoxidável com diâmetro interno entre 2-5 mm, no interior possuem um empacotamento esférico poroso de tamanho compreendido entre os 3-10 μm que permitem uma elevada eficiência na separação dos compostos. A fase móvel atravessa continuamente a coluna cromatográfica com pressões bastante elevadas e fluxo controlado. Posteriormente os analitos vão ser detetados por um detetor à saída da coluna. O sistema do HPLC encontra-se acoplado a um software que traduz a informação da separação, fornecida pelo detetor, num cromatograma (Porto 2014).

O desenvolvimento posterior da técnica de UHPLC permitiu aumentar ainda mais a eficiência da separação dos compostos, permitindo a utilização de colunas cromatográficas com diâmetro interno menor que 2 mm e empacotamento de 2 μm , possibilitando a deteção de partículas com dimensões menores, a aplicação de pressões mais elevadas, superiores aos 14 000 psi, o aumento do fluxo, e por último a diminuição do consumo de solvente, uma vez que na técnica de UHPLC o consumo de solvente é menor que na técnica de HPLC (Porto 2014). Para além das vantagens mencionadas, a metodologia de UHPLC permite obter um cromatograma com maior resolução e maior sensibilidade de deteção dos compostos, reduzindo o tempo de análise, que se apresenta como uma desvantagem atribuída à cromatografia líquida de alta pressão. Esta técnica tem vindo a tornar-se numa poderosa ferramenta para a quantificação de compostos em análises farmacêuticas, biomédicas, ambientais e alimentares (Porto 2014).

3.6.1- Equipamento de UHPLC

O equipamento deste sistema cromatográfico consiste em quatro componentes essenciais, uma bomba, um sistema de injeção, uma coluna de separação e um detetor, Figura 3.2 (WHO 2018).

O sistema de bombagem é composto por um filtro de solvente que impede a progressão de partículas pequenas passíveis de danificarem o sistema. A bomba proporciona a passagem da fase móvel pela fase estacionária a um fluxo controlado e a pressões elevadas. Este componente permite também, fixar ou variar, a proporção dos constituintes da fase móvel

no decorrer da corrida cromatográfica, obtendo-se uma eluição isocrática, caso as percentagens de solvente da fase móvel não variem, ou uma eluição em gradiente, se a percentagem dos solventes variar ao longo da separação (Porto 2014).

O sistema de injeção é responsável por injetar uma quantidade exata de amostra na fase móvel, que se encontra a ser bombeada constantemente para a coluna cromatográfica. Este sistema de injeção é automatizado, possibilitando a programação de injeções contínuas.

A coluna de separação é o elemento mais variável do equipamento, podendo apresentar vários comprimentos, diâmetros, empacotamentos e polaridade, estes parâmetros técnicos devem variar consoante os compostos a analisar. Quando a fase estacionária revela um carácter mais polar que o da fase móvel, o processo cromatográfico é designado de cromatografia de fase normal, contudo se a fase estacionária for menos polar que o solvente, a metodologia pode designar-se de cromatografia de fase reversa. Recentemente, as fases estacionárias mais utilizadas possuem sílica quimicamente modificada e as fases móveis são normalmente polares (Porto 2014).

Em cromatografia de fase reversa, RP-HPLC, o enchimento da coluna utilizado, é geralmente constituído por sílica quimicamente modificada, Tabela 3.4. O grupo funcional mais utilizado nesta cromatografia é o octadecil (C18). Ainda assim o tempo de retenção pode ser otimizado através do ajuste da composição da fase móvel (Toldrá and Nollet 2013).

Este tipo de metodologia, cromatografia de fase reversa, é fortemente utilizado nas indústrias farmacêuticas e alimentares, uma vez que se obtêm separações mais eficientes e reprodutíveis devido à estabilidade das colunas de sílica modificada.

A temperatura da coluna também pode ser um fator a controlar para aumentar a eficiência da separação, embora muitas separações sejam realizadas à temperatura ambiente, os sistemas atuais possuem estufas de modo a regular a temperatura a que ocorre o processo de separação (Porto 2014).

Tabela 3.4: Fases estacionárias de cromatografia reversa (Porto 2014)

Nomenclatura	Estrutura molecular da fase estacionária	Abreviatura
n-Octil	Si-(CH ₂) ₇ -CH ₃	C ₈
n-Octadecil	Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	C ₁₈
n-Fenil	Si-(CH ₂) _n -(C ₆ H ₅)	C ₆ H ₅
n-Cianopropil	Si-(CH ₂) ₃ -CN	CN
n-Aminopropil	Si-(CH ₂) ₃ -NH ₂	NH ₂

O detetor é o sistema que monitoriza continuamente o eluente que sai da coluna cromatográfica, permitindo a deteção e a quantificação dos analitos. Os detetores mais utilizados nestes equipamentos são os detetores espectrofotométricos, os detetores de

fluorescência, de índice de refração, de massa, de dispersão de luz e ainda detetores electroquímicos (Porto 2014).

Os detetores de HPLC/UHPLC devem cumprir determinados requisitos para que seja garantida a eficiência da quantificação, deste modo, estes componentes devem possuir elevada sensibilidade, limites de deteção suficientemente baixos, boa estabilidade e reprodutibilidade do sinal e resposta rápida ao sensor. Ainda assim, o sinal do detetor não deve ser influenciado pela temperatura, pela velocidade do fluxo e pela composição da fase móvel.

Os tipos de detetores mais utilizados são os detetores de UV/Vis e o de fluorescência. Os sinais emitidos pelo detetor são enviados para um dispositivo de recolha de dados, onde são processados todos os registos qualitativos e quantitativos do processo cromatográfico, originando-se um cromatograma (Porto 2014).

A quantificação e a identificação dos analitos eluídos, é conseguida através da comparação dos tempos de retenção e das áreas dos picos respetivos, com soluções padrões dos quais os tempos de retenção e as concentrações são conhecidos (Waters 2018).

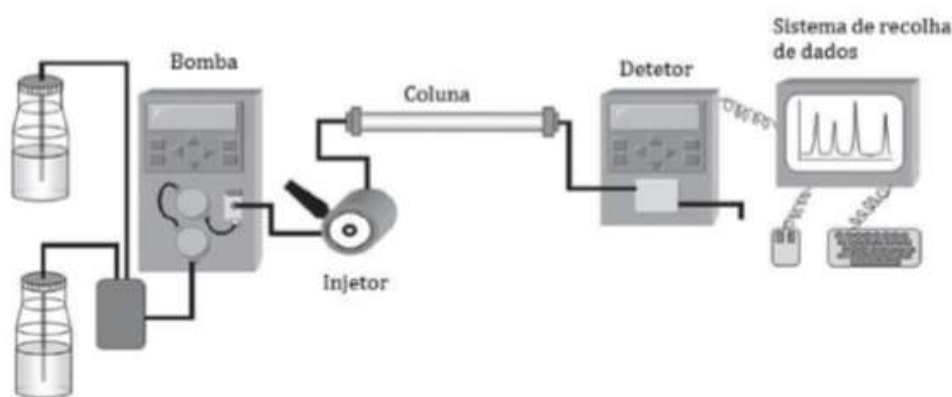


Figura 3.2: Diagrama operativo do sistema de UHPLC (Porto 2014).

3.7- Parâmetros de controlo de Qualidade e validação

A variabilidade de erros que podem suceder, aquando o decorrer de um ensaio interno laboratorial, pode comprometer significativamente o valor do resultado final. Nessa medida, é necessário que existam critérios universais e objetivos que confirmem credibilidade ao método desenvolvido e aos resultados que dele provêm.

A garantia da qualidade de um método desenvolvido ou adaptado requer que sejam cumpridos determinados princípios de controlo de qualidade, que embora não garantam a qualidade dos resultados, permitem aumentar a probabilidade da metodologia ser adequada para a sua finalidade (Comissão Técnica de Química 2011).

O controlo de qualidade, bem implementado e apropriado, revela se o laboratório possui equipamentos aptos para as análises que efetua, se o trabalho foi realizado por profissionais competentes, com formação e também se foi seguido um método validado documentado (Eurachem, 2002). Os princípios que regem este controlo foram formalizados em vários protocolos, os mais utilizados e reconhecidos estão organizados em três grupos, ISO /

IEC 17025: 1999, norma que se refere à competência técnica dos laboratórios, testes específicos e calibrações, ISO 9001:2015, norma que se refere à gestão de qualidade das instalações onde ocorrem as análises químicas, e princípios da OCDE de Boas Práticas de Laboratório (BPL): 1998, estas diretrizes estão relacionadas com a organização dos processos e das condições que cada laboratório adota para realizar estudos associados à regulamentação (Eurachem, 2002).

A confirmação de que os métodos são apropriados para o uso pretendido, advém de um processo de validação.

A validação de um método, segundo a ISO 5725-1:1994 é o processo utilizado para garantir que o procedimento empregue num determinado ensaio, teste ou metodologia é o adequado para o fim pretendido. Os resultados que se obtêm desta análise teórica conferem robustez, fidedignidade e qualidade à prática laboratorial desenvolvida. A validade de qualquer análise interna deve ser explicitada através do recurso a amostras padrão que são similares às amostras em estudo. A execução e toda a preparação indispensável à experiência devem ser descritas, caracterizadas e efetuadas em equipamentos e instrumentos que se encontrem devidamente calibrados e que cumpram as especificações estabelecidas para o correto funcionamento.

Os requisitos estipulados para a validação de um método interno são a gama de trabalho, a linearidade, os limites de deteção e de quantificação, a precisão, a repetibilidade e a exatidão.

- Gama de trabalho:

A gama de trabalho corresponde ao intervalo compreendido entre o valor inferior e o valor superior da concentração do analito determinada com precisão, exatidão e linearidade, nas condições estabelecidas para o ensaio. Dentro da gama de trabalho pode existir uma gama de trabalho linear, onde a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito. Os fatores limitantes do limite inferior da gama serão o limite de deteção e o limite de quantificação. O limite superior depende do sistema de resposta do equipamento (Comissão Técnica de Química 2011)

- Linearidade:

A linearidade traduz-se na eficácia de um método em produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em estudo nas amostras analisadas (Ribani *et al.* 2004). Para determinar a linearidade é necessário que seja conhecida a relação entre a resposta medida e a concentração do analito, recorrendo-se a padrões internos e padrões externos.

A linearidade pode ser obtida através de uma expressão matemática que permite determinar a concentração do analito na amostra:

$$y = ax + b$$

Em que,

y= resposta medida (absorvância, área do pico)

x= concentração

a= declive da curva de calibração

b= intersecção com o eixo do y, quando x=0

Pode avaliar-se a linearidade através de um gráfico entre os resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então a partir dos cálculos da regressão linear. O coeficiente de correlação linear, r, é um parâmetro inerente às regressões lineares que indica o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, é requerido um valor superior a 0,995. A adequação da reta também pode ser verificada por meio de um modelo estatístico, através do cálculo dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da regressão. Partindo-se de um conjunto de pares ordenados, calculam-se as funções de calibração linear e não linear, assim como os respetivos desvios-padrão residuais (Relacre 2000).

$$t_{calculado} = \frac{\text{resíduo}}{Sr/\sqrt{n}}$$

Em que:

resíduo = $|x_{medido} - x_{calculado}|$

Sr = desvio padrão dos resíduos

n = número de pontos

- Limite de deteção

O limite de deteção (LD), é considerado a concentração mínima do analito que pode ser detectada na amostra. Este parâmetro refere-se à concentração mínima medida acima da qual existe a possibilidade de se detectar o analito com certeza estatística admissível (Ribani 2004).

O LD pode ser calculado através de uma equação:

$$LD = x_0 + 3,3 * s_0$$

Em que:

x_0 = média aritmética do teor medido numa série de brancos, preparados de forma independente

s_0 = desvio padrão associado a x_0

O limite de deteção também pode ser calculado através de uma relação sinal/ruído, comparando-se as medições dos sinais do analito na amostra, em baixas concentrações

conhecidas, e um branco dessas amostras. As relações 3:1 e 2:1 são as geralmente aceites como estimativas do limite de deteção (Relacre 2000).

Limite de quantificação

O limite de quantificação, LQ, refere-se à concentração mais baixa do analito que se consegue quantificar com nível aceitável de precisão e exatidão. Geralmente corresponde ao padrão de calibração com concentração mais baixa (Comissão Técnica de Química 2011). O LQ pode ser calculado através da razão sinal ruído, 10:1, ou através de uma equação semelhante à utilizada para determinar o limite de deteção.

$$LQ = x_0 + 10 * s_0$$

Em que:

x_0 = média aritmética do teor medido numa série de brancos, preparados de forma independente

s_0 = desvio padrão associado a x_0

- Precisão

A precisão é geralmente expressa pelo desvio padrão, contudo também se pode exprimir através da repetibilidade e da reprodutibilidade. Este requisito avalia a dispersão de resultados entre análises independentes, referentes à mesma amostra, e/ou padrão, nas mesmas condições.

A repetibilidade e a reprodutibilidade são inerentes à concentração de analito, sendo importante determiná-las para diferentes concentrações do mesmo, devendo ser estabelecida uma relação entre a precisão e a concentração do analito.

O desvio padrão é normalizado com base na concentração de amostra o que lhe confere praticamente invariância ao longo da gama de trabalho (Comissão Técnica de Química 2011).

- Repetibilidade

A repetibilidade consiste na uniformidade e na consistência dos resultados oriundos de medições sucessivas de um mesmo ensaio, todas elas efetuadas nas mesmas condições:

- Mesmo procedimento
- Mesmo observador
- Mesmo equipamento utilizado
- Mesmo local
- Repetições realizadas com pouca distância temporal

Este parâmetro teórico pode ser expresso consoante a dispersão dos resultados e pode ser definida por meio de análise de padrões, material de referência ou adição de branco em várias concentrações que se encontrem dentro da gama de trabalho.

Uma forma de garantir que existe repetibilidade é através do cálculo do limite de repetibilidade “r”, a partir do desvio padrão dos resultados de ensaios efetuados nas mesmas condições. Este cálculo determina se a diferença entre as análises duplicadas de uma amostra é significativa.

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade (r) calcula-se da seguinte forma:

$$r = 2,8 * Sr$$

Onde:

Sr – corresponde ao desvio-padrão dos resultados considerados

Contudo se forem realizados mais do que dois ensaios, duplicados, o limite de repetitividade (r) é calculado de acordo com a Norma ISO 5725-6 (Relacre 2000).

- **Recuperação**

A recuperação é obtida pela análise de amostras às quais lhes são adicionadas quantidades conhecidas do analito em pelo menos três concentrações diferentes, perto do limite de deteção, próxima do valor máximo da gama de trabalho, ou ainda no valor médio da gama de trabalho.

O cálculo da recuperação traduz-se na seguinte expressão:

$$recuperação (\%) = \frac{(C1 - C2)}{(C3)} * 100$$

Em que,

C1- Concentração do analito na amostra que sofre adição do mesmo

C2- Concentração do analito na amostra que não sofre adição

C3- Concentração do analito adicionado

Porém, o cálculo da recuperação possui uma limitação, uma vez que o analito adicionado não se encontra na mesma forma que a amostra, a adição de uma concentração de analito mais facilmente detetável pode resultar em percentagens de recuperação superiores às realmente obtidas (Relacre 2000; Comissão Técnica de Química 2011).

3.8- Aminas Biogénicas: Microrganismos produtores

Atualmente, existe uma grande variedade de estudos publicados que referem a família das Enterobacteriaceae como o microbiota mais frequentemente encontrado em produtos contaminados com elevado teor de aminas biogénicas, quer pescado, quer produtos cárneos.

As *Enterobacteriaceae* são uma família de bactérias Gram-negativas que possuem 51 géneros e 238 espécies de bactérias. Esta grande família procarionte é caracterizada por ser anaeróbia facultativa, produzindo ácido a partir da fermentação da glucose (ISO 21528-2 2016).

Não obstante, destacam-se as bactérias *Morganella morganii*, *Klebsiella* e *Hafnia* como as principais enterobactérias encontradas no pescado proveniente do oceano, sendo também aquelas comumente associadas a surtos de intoxicação histamínica (Silveira *et al.* 2001). As bactérias que produzem histidina descarboxilase, supra mencionadas, são maioritariamente mesófilas (Fallis 2013) e encontram-se naturalmente nas branquias, na pele, nos intestinos e na cavidade abdominal dos peixes (Kim *et al.* 2001).

Contudo, em produtos cárneos, existe maior abundância de aminas como a Putrescina e Cadaverina, especialmente após a fase de *rigor mortis*, quando se inicia o processo de putrefação. As espécies identificadas como principais produtoras destas aminas são as *Pseudomonas* spp, nomeadamente da amina putrescina, e mais uma vez as *Enterobacteriaceae*, que produzem também a amina cadaverina. Também as espécies dos géneros *Streptococcus* do grupo D e *Proteus* (Trabulsi and Alterthum 2015) podem ser encontradas frequentemente em produtos resultantes de fermentação, estando associadas à produção de tiramina.

A produção de aminas ocorre apenas a uma temperatura superior a 4°C e após um período de 4h de exposição a essa temperatura. As bactérias produtoras destes metabolitos podem ser inativadas através de processos térmicos como a congelação ou aquecimento, contudo, após contaminação com o metabolito, nenhum tratamento térmico é eficiente na destruição da amina (Gomes *et al.* 2014).

A organização Food Drugs Administration (FDA) defende que algumas das bactérias produtoras de histidina descarboxilase são halofílicas (FDA 2001) o que significa que em produtos salgados também é suscetível o aparecimento de aminas biogénicas. A Organização das nações unidas para a alimentação e agricultura 1997, confirmou o carácter halotolerante de *Morganella morganii*, demonstrando que, mesmo não sendo muito resistente ao NaCl, ela consegue desenvolver-se em meios que contenham até 5% de NaCl. Segundo (Morii and Kasama 2004) o *Photobacterium phosphoreum* é capaz de produzir a enzima histidina descarboxilase em culturas com 5% de NaCl armazenadas a 7°C. No entanto, para além de halofílicas também podem possuir um carácter anaeróbio facultativo podendo existir produção de descarboxilases em peixes que se encontram embalados. No estudo desenvolvido por Emborg e colaboradores em 2006, é comprovado que a maioria das bactérias existentes no atum fresco embalado em atmosfera modificada com 60% de dióxido de carbono e 40% de azoto, quando este se encontra em decomposição são semelhantes à *Morganella morganii*,

originando mais de 5000 mg/kg de histamina após 24 dias armazenados à temperatura de 1,7°C.

3.9- Metodologias de identificação de microrganismos produtores de aminas

As espécies produtoras de enzimas descarboxilase são geralmente introduzidas no pescado durante o manuseamento pós captura, considerando-se de extrema importância, do ponto de vista da qualidade e da segurança alimentar, que sejam desenvolvidos métodos consideravelmente rápidos de identificação destes microrganismos (Gouveia 2009).

O meio de Niven foi o primeiro meio de cultura a ser utilizado na identificação de bactérias produtoras de histamina, apresentando-se como um método de rastreamento. Este meio traduz-se na utilização de um indicador cromático com intuito de conferir às bactérias histidina descarboxilase uma tonalidade púrpura (Dias 2013).

Porém, autores como Roig-Sagués *et al.* (1997) descrevem a presença de falsos-positivos e falsos negativos, devido à formação de compostos alcalinos que aumentam o pH do meio e conferem a outras bactérias a coloração púrpura característica das bactérias histidina descarboxilase. Por esse motivo, o cerne de inúmeros estudos já publicados, tem sido a utilização e desenvolvimento de métodos moleculares para a determinação e identificação de microrganismos produtores de histamina e de outras aminas biogénicas. Estes métodos são independentes de cultivo e permitem uma maior acurácia nos resultados, porque recorrem a vários genes alvo possibilitando a identificação e/ou quantificação de todas as bactérias envolvidas na produção de aminas biogénicas numa determinada amostra.

As técnicas de *Polymerase Chain Reaction*, PCR, e de hibridização de DNA são as metodologias mais usuais, apresentando vantagens como: rapidez, sensibilidade, simplicidade e especificidade na deteção dos genes alvo (Takahashi *et al.* 2003).

A biologia molecular permite a antecipação de medidas de controlo que impeçam o desenvolvimento dos microrganismos presentes. Entre as técnicas moleculares utilizadas, a Multiplex PCR é a mais utilizada na deteção de estirpes potencialmente produtoras de histamina, tiramina, putrescina, cadaverina e feniletilamina, uma vez que a deteção de todas as aminas pode ser efetuada em simultâneo.

Ainda assim, segundo Björnsdóttir-Butler *et al.* (2010), a metodologia mais usual é a complementaridade entre as técnicas, efetuando-se uma primeira fase de cultivo em meio diferencial, procedida por uma segunda fase de verificação de resultados através de técnicas moleculares.

3.9.1- Metodologias de identificação de microrganismos: Testes automatizados

A microbiologia clínica é uma vertente científica que ainda utiliza técnicas pouco automatizadas quando comparadas com a química ou com a imunologia que têm vindo a tornar-se ciências cada vez mais recorrentes de equipamentos e sistemas informáticos.

Contudo, nos últimos 20 anos, foi notório o desenvolvimento de inúmeros sistemas automatizados de identificação bacteriana no âmbito da microbiologia, tornando-se o panorama desta ciência menos moroso, mais económico e menos questionável, uma vez que a probabilidade que ocorram erros de determinação, classificação, ou ainda resultados dúbios, falsos negativos ou falsos positivos, é quase nula (Ligozzi *et al.* 2002).

O sistema Vitek, foi desenvolvido na década de setenta do século passado, evoluindo até à atualidade como Vitek 2, sendo caracterizado como um sistema que executa todos os passos necessários para a identificação bacteriana, através de um inóculo primário isolado. Esta metodologia permite combinar um sistema ótico com um fluorímetro multicanal facultando leituras de fluorescência, turvação e colorimetria, Figura 3.3 (Pincus 2010).



Figura 3.3: VITEK 2 Compact Instrument and Workstation (Pincus 2010)

O sistema Vitek 2 foi desenvolvido especificamente para microbiologia industrial e clínica existindo atualmente quatro cartões de reagentes disponíveis para a identificação de diferentes classes de organismos.

Os cartões de análise utilizados no Vitek 2, possuem 64 poços, cada um contendo um teste individual onde podem vir a ser medidas várias atividades metabólicas como a acidificação, alcalinização, hidrólise enzimática, crescimento na presença de inibidores, produção de enzimas descarboxilase, assim como outros. Os cartões possuem ainda códigos de barras que permitem o acesso a informações sobre o produto, como o número do lote e a data de validade, Figura 3.4 (Pincus 2010).

Contudo, para que os resultados das análises sejam credíveis é necessário tomar em consideração parâmetros de cultura e inoculação requeridos pelo sistema, como o tipo e o tempo do meio de cultura e a turbidez do inóculo, que deve ser medida obrigatoriamente antes de se efetuar a análise, sendo estipuladas densidades ótimas de análise consoante a bactéria a determinar (Pincus 2010).

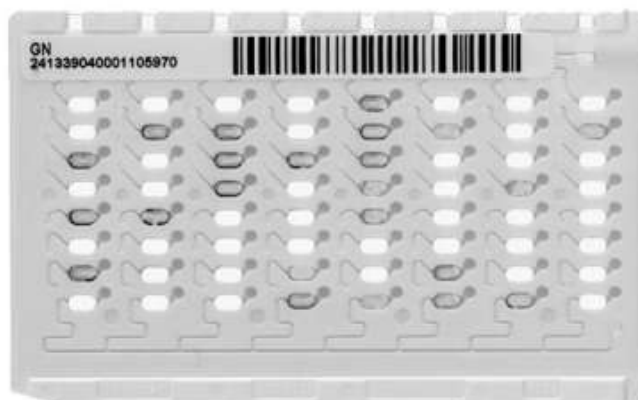


Figura 3.4: Cartas de identificação colorimétrica (Pincus 2010)

4- Materiais e Métodos

Na presente dissertação todos os métodos analíticos foram efetuados no Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP.

O estudo aqui apresentado traduz-se no desenvolvimento de uma metodologia, a ser empregue no método de cromatografia líquida de *ultra performance*, UHPLC, que possui como principal intuito a determinação de aminas biogénicas, com recurso à utilização de padrões. A metodologia desenvolvida teve como base o trabalho anteriormente realizado no laboratório de referência do Departamento de Alimentação e Nutrição por (Mendes 2018). As matrizes alimentares selecionadas para o estudo são, atum fresco, atum enlatado e camarão congelado.

Em simultâneo foi também avaliado o desenvolvimento microbiológico, com visa à possível identificação e deteção de espécies produtoras de aminas. Estes ensaios foram efetuados em amostras de atum em conserva imediatamente após abertura (T0) e em amostras de atum fresco e camarão congelado imediatamente após aquisição (T0) e com diferentes condições de conservação (T1, 24 horas; T2, 48 horas e T3, 120 horas a $3\pm 2^{\circ}\text{C}$).

As aminas cadaverina, putrescina, histamina, triptamina e tiramina foram extraídas das matrizes com ácido tricloroacético TCA a 5% (m/v) sendo o pH da extração neutralizado com a adição de NaOH.

O extrato resultante foi posteriormente derivatizado com o reagente 6 aminoquinolil-Nhidroxisucinimidil carbamato (AQC).

A separação e análise dos compostos aminados foi efetuada através do método de UPLC[®] Acquity da Waters[®], cromatografia de fase reversa, com detetor PDA a 260 nm de comprimento de onda.

A identificação dos metabolitos foi efetuada por comparação com os tempos de retenção dos respetivos padrões.

4.1- Amostras

As amostras selecionadas, nomeadamente, atum fresco, conservas de atum ao natural e camarão congelado foram adquiridas em superfícies comerciais, na região da grande Lisboa.

As matrizes foram preparadas, segundo a norma ISO 6887:2017, parte 3: regras específicas para a preparação de peixe e produtos da pesca, e submetidas a um período de refrigeração a $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$, compreendido entre 0h a 120h, procedendo-se simultaneamente à identificação e quantificação das aminas biogénicas e à pesquisa microbiológica de bactérias produtoras destes metabolitos nos tempos 0h, 24h, 48h e 120h.

No estudo foram utilizadas 3 amostras de atum fresco, AF1, AF2, AF3, compradas no mesmo local e em semanas diferentes, 8 amostras de atum em conserva, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8 e uma amostra de camarão proveniente de aquacultura, Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Características e proveniência das amostras selecionadas na presente dissertação e respetiva sigla de denominação

Tipo de amostra	Sigla	Origem / Produção	Ingredientes
Atum Fresco	AF1	Atlântico centro	-----
Atum Fresco	AF2	Atlântico nordeste	-----
Atum Fresco	AF3	Atlântico centro	-----
Atum Conserva	C1	Produzido em Portugal	Atum (70%), Água (29%) e sal (1%).
Atum Conserva	C2	Produzido em Portugal	Atum (70%), água e sal
Atum Conserva	C3	Produzido em Portugal, Açores	Atum, água e sal
Atum Conserva	C4	Produzido em Espanha	Atum (70%), água e sal
Atum Conserva	C5	Produzido em Espanha	Atum (70%), água e sal
Atum Conserva	C6	Produzido em Portugal	Atum (70%), água (29%) e sal (1%)
Atum Conserva	C7	Produzido em Portugal	Atum (70%), água e sal
Atum Conserva	C8	Produzido em Portugal	Atum (70%), água (29%) e sal (1%)
Camarão de aquacultura	-----	Proveniente do Vietnam	-----

4.1.1- Preparação das amostras

- Preparação da amostra de atum fresco

A amostra de atum fresco foi seccionada cuidadosamente em câmara de fluxo laminar, com recurso a bisturis higienizados em álcool 70% (v/v) e flamejados à chama. A pele, as escamas e as espinhas/ossos que foram separadas e removidas do músculo do peixe, foram seladas e descartadas para o contentor de eliminação de resíduos. O músculo do atum foi deixado em refrigeração, $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante um período de 24h, 48h e 120h para posterior análise química e microbiológica, procedendo-se de imediato à análise do tempo 0h.

- Preparação das amostras de conserva

As conservas seleccionadas para a análise foram submetidas a um processo de higienização antes da sua abertura, por lavagem em água corrente, com principal insistência na zona de abertura e em redor da anilha, e por secagem. No mesmo instante foram flamejadas após passagem com algodão embebido em álcool 70% (v/v). De seguida as conservas foram abertas em camara de fluxo laminar, retirando-se cuidadosamente todo o conteúdo das embalagens metálicas, com o auxílio de uma colher de plástico estéril, para uma saco de recolha de amostra estéril.

Após este processo de preparação procedeu-se à análise química e microbiológica.

- Preparação da amostra de camarão congelado

A amostra de camarão foi descongelada e armazenada sob refrigeração a uma temperatura de $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24h, 48h, 120h. Após término dos referidos períodos, removeu-se meticulosamente o cefalotórax e o restante exosqueleto do camarão restando apenas para análise o músculo. Este processo de manipulação foi efetuado em camara de fluxo laminar, procedendo-se imediatamente às determinações químicas e microbiológicas. O ensaio do tempo 0 horas ocorreu 1h30m após o camarão ser submetido ao processo de descongelação.

4.2- Laboratório de Química - Quantificação das aminas biogénicas

4.2.1- Reagentes e padrões

Os reagentes utilizados foram os seguintes: Ácido tricloroacético (TCA) com grau de pureza 99,5% da marca Merck, EMD Millipore Corporation; Ácido clorídrico (HCl), 0,1 N, Carloerba; Hidróxido de Sódio (NaOH), 6 N da marca Merck, EMD Millipore Corporation; Conjunto de reagentes Waters[®], AccQ Tag Ultra Chemistry Kit, constituído pelo derivatizante AccQ-Tag Ultra Reagent Powder, 6 aminoquinolil-N-hidroxisucinimidil carbamato, pela solução tampão AccQ-Tag Ultra Borate Buffer e pelo diluente do derivatizante AccQ-Tag Ultra Reagent Diluent, acetonitrilo; Água, com pelo menos grau II de pureza, proveniente de um sistema de purificação Mili-Q (Millipore).

Os padrões utilizados foram os seguintes: Histamina ($\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3$), para HPLC, com grau de pureza $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich; Tiramina ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}$), para HPLC, com grau de pureza de 99%, Sigma-Aldrich; Triptamina ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2$), para HPLC, com grau de pureza de 98%, Sigma-Aldrich; Cadaverina ($\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_2$), para HPLC, com grau de pureza $\geq 97\%$, Sigma-Aldrich; Putrescina ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2$), para HPLC, com grau de pureza $\geq 98,5\%$, Sigma-Aldrich; 1,7-Diaminoheptano ($\text{NH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{NH}_2$), com grau de pureza de 98%, Sigma-Aldrich

4.2.2- Equipamento

Moinho de facas (Grindomix), marca Retsch modelo GM 200; Balança analítica, modelo XP 205, com precisão de 0,0001 g, Mettler Toledo; Vortex, modelo VP-1, Grant-Bio; Agitador horizontal, modelo KS-15, Edmund Buhler; Centrifuga, modelo 5804R, Eppendorf; Estufa, modelo Beschickung 100-800 com controlo de temperatura $101,5 \pm 2,0$ °C, Memmert; Sistema de UPLC® da Waters®, modelo Acquity, com detetor PDA; Coluna analítica C18, de fase reversa, ACCQ-TAG Ultra C18 com 2,1 mm de diâmetro e 100mm de comprimento; Arca congeladora, -20°C, Whirlpool; Ultracongelador, -80°C, critério de aceitação $\leq -70^\circ\text{C}$.

4.2.3- Preparação de soluções

- Preparação da solução de ácido tricloroacético, 5% (m/v)

Pesou-se numa balança analítica 5 g do reagente TCA para um balão de vidro certificado, de 100 mL, perfazendo-se o volume com água ultrapura MiliQ e agitando-o no final.

- Soluções padrão

- Preparação das soluções padrão de Histamina, Tiramina, Triptamina, Cadaverina e Putrescina

Pesou-se individualmente 22,5 mg de cada padrão numa balança analítica, para um balão certificado de 10 mL. Perfez-se o volume com ácido clorídrico 0,1 M. O balão foi fechado e agitado até completa dissolução.

- Preparação da solução de padrão interno

Foi pesado numa balança analítica 5250 mg do reagente 1,7-Diamianoheptano, (DAH), um balão certificado de 100 mL perfazendo-se o volume do mesmo. O balão foi fechado e agitado.

- Reconstituição do derivatizante

Previamente ao ensaio cromatográfico, as amostras têm que sofrer um processo de derivatização, os reagentes utilizados nesta etapa experimental pertencem ao kit da Waters®, AccQ Tag Ultra Chemistry.

O agente derivatizante, AccQ-Tag Ultra Reagent Powder, presente no kit supracitado, requer reconstituição através da adição de 1 mL do reagente AccQ-Tag Ultra Reagent Diluent, exigindo, após agitação mecânica no vortéx, a encubação durante 10 min a 55°C.

4.2.4- Extração das amostras

Todas as amostras sofreram um processo de extração idêntico, iniciado pelo fracionamento e homogeneização num moinho mecânico (Grindomix GM 200). As amostras foram pesadas em balança analítica, cerca de 2 g de cada toma de amostra, em duplicado para um tubo cônico de 50 mL, adicionando-se sequencialmente 9,3 mL da solução de TCA 5% (m/v), preparada no próprio dia, e 180 µL da solução padrão de 1,7-Diaminoheptano, previamente diluída na razão de 1:10. Após 30 min em agitação vigorosa, foram adicionados 500 µL de NaOH, para neutralizar o pH da extração, e procedeu-se no imediato à centrifugação dos tubos durante 15 min, a 20°C e 3.234 x g .

O sobrenadante foi removido cuidadosamente com uma pipeta de pasteur e filtrado por filtros de seringa com membrana GHP de 25 mm e poro 0,2 µm.

Os filtrados foram armazenados em tubos de 2 mL, distribuindo-se equitativamente 1 mL por tubos, e ultracongelados a -80°C.

Foram preparadas simultaneamente amostras com adição de padrão, adicionando-se aquando da extração, 500 µL de cada padrão de Histamina, Putrescina, Cadaverina, Triptamina, e Tiramina a 2250 mg/L.

4.2.5- Derivatização das amostras

Preparado o reagente de derivatização, procedeu-se à derivatização dos extratos amostrais pipetando-se para um vial 80 µL de tampão AccQ-Tag Ultra Borate Buffer, 10 µL do extrato e 20 µL de agente derivatizante. Após agitação mecânica dos vials em vórtex, estes foram também deixados a incubar por 10 min a 55°C na estufa.

4.2.6- Análise cromatográfica

As condições estabelecidas para a análise cromatográfica foram as seguintes, Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Condições da análise cromatográfica

Condições estabelecidas para a análise cromatográfica	
Fluxo	0,7 mL/min
Fase Móvel	Eluente A: 5% AccQ Tag Ultra Eluente A (formato de amónio em água /acetonitrilo/ácido fórmico, 84: 10: 6) e AccQ Tag Ultra Eluente B: 2% de ácido fórmico em acetonitrilo
Fase estacionária	Coluna analítica AccQ-Tag Ultra da marca Waters [®] , de fase reversa contendo sílica polimericamente modificada com C18, 100 x 2,1 mm

Tabela 4.2: Condições da análise cromatográfica (continuação)

Condições estabelecidas para a análise cromatográfica	
Deteção	UV/Vis: 260 nm para todas as aminas

Tabela 4.3: Condições aplicadas na eluição em gradiente

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	99	0,1
0,54	99	0,1
5,74	85	15
7,77	40	60
8,73	40	60
10	99	0,1

- Identificação das aminas

Todos os analitos foram identificados por comparação com os cromatogramas dos padrões utilizados.

- Quantificação das Aminas

A quantificação dos analitos foi efetuada num sistema de tratamento de dados que se encontra associado ao UHPLC da Waters®.

O software Empower permitiu calcular a concentração das aminas biogénicas através das áreas dos picos e das curvas de calibração previamente construídas.

4.3- Laboratório de Microbiologia- Determinação, quantificação e identificação de microrganismos

4.3.1- Meios de cultura e reagentes

Água peptonada tamponada (APT), Dilubag 3L, Biomerieux SA; Triptona sal (TS) Diluent, Biokar; Meio plate count Agar (PCA): Composto por 5,0 g de extrato de digestão enzimática de caseína, 2,5 g de extrato de levedura, 1 g de glucose anidra, 9 g a 18 g de agar, dependendo da sua consistência, e 1000 mL de água. Segundo a norma ISO 4833, referente a contagem a 30°C \pm 1°C; Meio Violet red bile glucose agar (VRBG): Composto por 7,0 g de extrato de digestão enzimática de tecidos de animais, 3,0 g de extrato de levedura, 1,5 g de extrato de sais biliares, 10,0 g de glucose, 5,0 g de cloreto de sódio, 0,03 g de vermelho neutro, 0,002 g de roxo cristal, 9 g a 18 g de agar, dependendo da consistência do agar, e 1000 mL de água. Segundo o Anexo A, Capítulo A.2 da ISO 21528, referente à deteção e contagem de Enterobactereaceas; Meio columbia agar com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (COS):

Composto por 12,0 g de hidrolisado pancreático de caseína, 5,0 g de hidrolisado péptico de tecido animal, 3,0 g de extrato de levedura, 3,0 g de extrato de carne de vaca, 1,0 g de amido de milho, 5,0 g de cloreto de sódio, 13,5 g de agar e 5% de sangue de ovelha, desfibrinado (Becton Dickinson GmbH, 2013); Meio triptose soja agar (TSA): Composto por 15,0 g de hidrolisado pancreático de caseína, 5,0 g de Hidrolisado papaínico de soja, 5,0 g de cloreto de sódio e 15,0 g de agar (Becton Dickinson GmbH, 2014); Caldo de tioglicolato com resazurina: Composto por 15,0 g de triptona, 5,0 g de extrato de levedura, 5,0 g de tioglicolato de sódio, 5,0 g de L-cistina, 5,5 g de glucose, 2,5 g de cloreto de sódio, 0,001 g de resazurina, 0,75 g de agar (Plast Labor microbiologia); Solução salina 0,45% NaCl, pH 5-7,2, Vitek 2 compact.

4.3.2- Equipamentos:

Banho de água em ebulição, $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ Julabo TW12; Banho de água $46^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, certificado, Memmert; Balança digital monoprato, Mettler Toledo PM 200, certificada; Homogeneizador peristáltico, seward stomacher 400 EVO; Estufa $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, Sanyo incubator CFC free; Estufa $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, Sanyo CFC free; Teste automatizado Vitek 2 compact, biomérieux.

Todo o equipamento anteriormente referenciado, com exceção do Vitek 2, e todo o material de uso corrente neste laboratório, que foi utilizado na presente dissertação, está descrito e segue as especificações presentes no capítulo 6 das normas ISO 21528-2:2017 e ISO 4833-1:2013, onde são referenciadas as normas ISO 7218:2014 referente à microbiologia de alimentos e alimentação animal - Requisitos gerais para orientação de exames microbiológicos e a ISO 835:2007, para o tipo e utilização de pipetas automáticas.

4.3.3- Análise microbiológica das amostras de atum fresco e camarão

- Preparação das diluições:

As diluições foram executadas segundo a norma ISO 6887-3:2017 referente à preparação de amostras para teste, suspensão inicial e diluições decimais para exames microbiológicos, parte 3: Regras específicas para a preparação de peixe e produtos da pesca.

Nos tempos estipulados para o ensaio 0h, 24h, 48h e 120h, efetuou-se a primeira diluição, 10^{-1} .

Foi pesado à chama 10 g de amostra para um saco com filtro e adicionados 90 mL de água peptonada.

Recorreu-se ao Stomacher, para homogeneizar a amostra durante 60 segundos.

Após a homogeneização mecânica, foram realizadas as restantes diluições, transferindo-se 1 mL da primeira diluição, 10^{-1} , para um tubo com 10 mL de triptona sal, agitando-se o tubo entre 10 a 20 segundos. A solução resultante possui um fator de diluição de 10^{-2} . A metodologia repetiu-se para a obtenção de diluições decimais sucessivas até ao fator de diluição 10^{-8} .

- Inoculação do meio de enriquecimento:

Preparam-se oito tubos de vidro esterilizados com 10 mL de água peptonada nos quais se adicionou 1 mL de cada diluição, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Os tubos foram deixados a incubar durante 24h a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

- Inoculação por incorporação:

Das várias diluições, preparadas em 3.15, são pipetados 1 mL diretamente para placa de Petri, vertendo-se o meio de cultura sólido, previamente fundido e estabilizado à temperatura $46 \pm 1^{\circ}\text{C}$, segundo a norma ISO 11133:2014, sobre a diluição, agitando-se cuidadosamente as placas de modo a distribuir e incorporar a diluição.

No presente estudo, foram utilizados os meios de VRBG em dupla camada e PCA para inoculação por incorporação.

As placas de ambos os meios foram incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ para o meio VRBG, e $72\text{h} \pm 3\text{h}$ para o meio PCA, segundo as normas ISO 21528-2:2017 e ISO 4833:1-2013, respetivamente.

As colónias obtiveram-se à superfície e no interior do agar como resultado da metodologia apresentada na Figura 4.1.

Implementação do método analítico para determinação de aminas biogénicas em amostras de pescado e produtos de pesca. Avaliação de processos para a sua formação

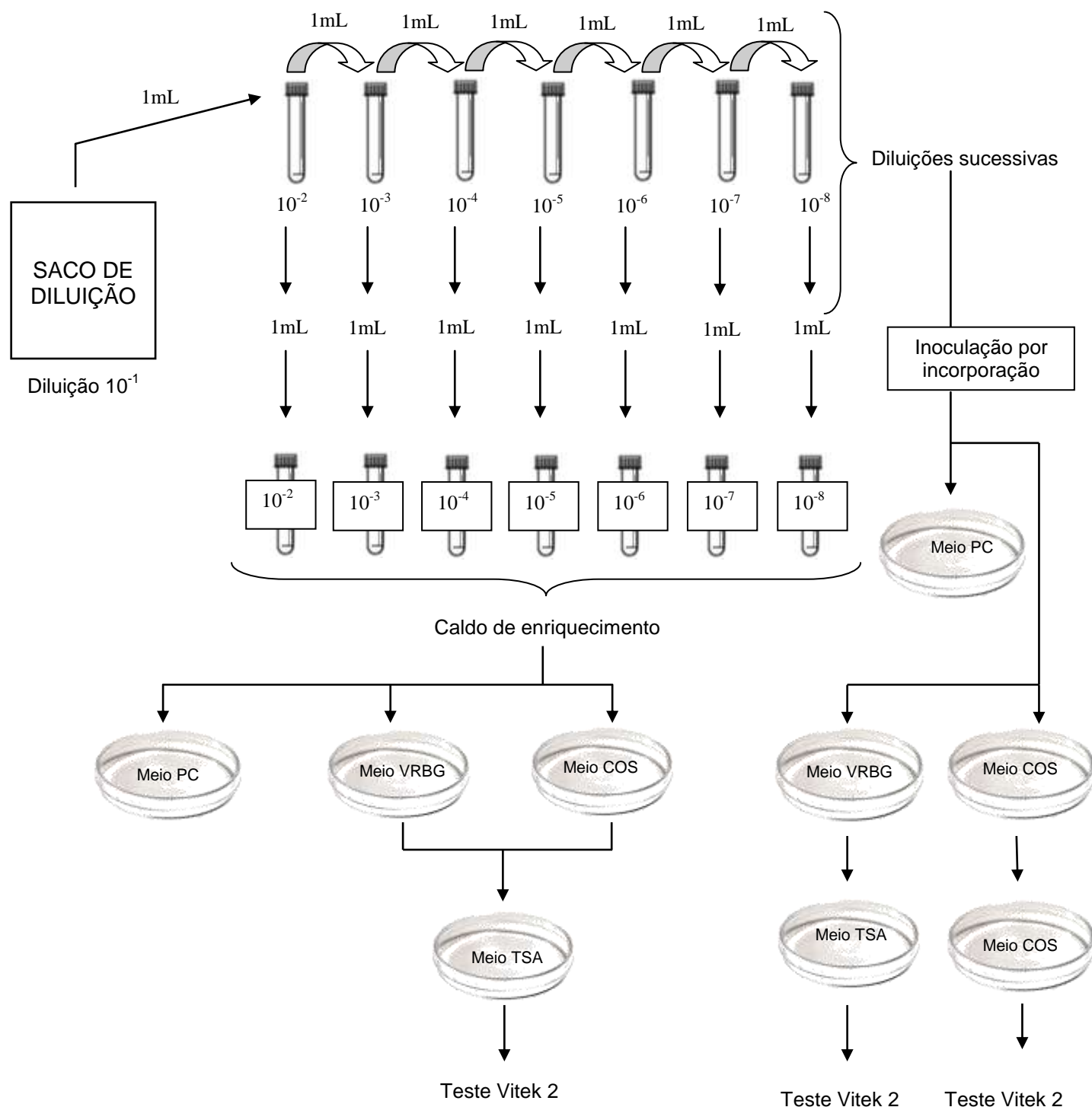


Figura 4.1: Esquema sucinto da metodologia aplicada para pesquisa e contagem de microrganismos produtores de aminas biogénicas.

- Passagem dos caldos de enriquecimento

Após o período de incubação, 24h a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, dos meios de enriquecimento das oito diluições, procedeu-se ao isolamento em placas de meio VRBG e em placas de meio COS. Todo o procedimento foi efetuado à chama, começando-se inicialmente por mergulhar uma ansa de 10 μL no interior de um dos tubos e terminando com o espalhamento à superfície dos meios, Figura 4.2. O procedimento repetiu-se de igual forma para os restantes tubos.

Sendo posteriormente incubadas as placas de COS e VRBG novamente a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h.

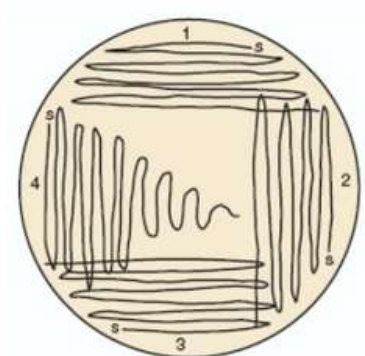


Figura 4.2: Esquema ilustrativo do processo de espalhamento com ansa, início em 1 e término em 4

- Preparação das culturas puras

Após incubação dos meios anteriores, selecionaram-se colónias com morfologia, aspeto e cor diferentes, presentes nas últimas diluições com cultura, segundo o esquema da Figura 4.3.

A repicagem fez-se para meio TSA que incubou a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h.

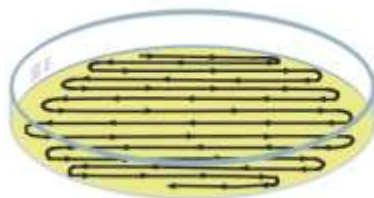


Figura 4.3: Esquema ilustrativo do processo de repicagem

4.3.4- Análise microbiológica das conservas de atum

- Preparação das diluições

As diluições foram executadas segundo a norma ISO 6887-3:2017, Regras específicas para a preparação de peixe e produtos de pesca, referente à preparação de amostras para teste, suspensão inicial e diluições decimais para exames microbiológicos.

Foram pesadas à chama 10 g de amostra para um saco com filtro e adicionados 90 mL de APT. A homogeneização foi efetuada durante 60s por meio do equipamento Stomacher.

Após a homogeneização mecânica, foi realizada a diluição 10^{-2} , transferindo-se 1 mL da primeira diluição, 10^{-1} , para um tubo com 10 mL de triptona sal.

O saco com filtro que continha a diluição 10^{-1} foi colocado a incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h.

- Inoculação das diluições

Foram transferidos para placas de petri 1 mL de cada diluição, 10^{-1} e 10^{-2} para incorporação em meio PCA e VRBG, este último em dupla camada.

As placas foram incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ para o meio VRBG e durante $72\text{h} \pm 3\text{h}$ para o meio PCA, segundo as normas ISO 21528-2:2017 e ISO 4833:1-2013, respetivamente.

Em simultâneo, foram também transferidos 1 mL das diluições 10^{-1} e 10^{-2} para tubos de tioglicolato com resazurina. A incubação dos tubos ocorreu em condições de anaerobiose induzida por um gerador com indicador de ausência de O_2 a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h.

- Passagem da diluição 10^{-1}

Findado o período de 24h de incubação das diluições 10^{-1} presentes nos sacos com filtro, foi inserida nos sacos de diluição uma ansa de 10 μL , procedendo-se de imediato à sua passagem pela superfície do meio COS que incubou a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h.

4.3.5- Identificação das estirpes

- Preparação das culturas puras

Após incubação dos meios anteriores, selecionaram-se colónias com morfologia, aspeto e cor diferentes, presentes nas últimas diluições com cultura.

O isolamento foi feito em meio TSA e COS sendo deixados a incubar mais uma vez a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h.

- Identificação microbiológica: Teste automatizado Vitek 2

Obtidas as culturas puras em meio TSA e COS, quer das amostras de atum e camarão, quer das amostras de conservas, concluiu-se o estudo microbiológico com a identificação das bactérias.

Para tal, recorreu-se ao teste automatizado Vitek 2, transferindo-se 3 mL de solução salina para tubos específicos de análise Vitek.

Com o auxílio de uma ansa, as colónias foram inseridas nos tubos de solução salina, sendo medida a densidade do tubo no final de cada inserção. O intervalo de densidade considerado ótimo para a determinação de bactérias Gram negativas e Gram positivas é compreendido entre 0,50-0,63, sendo a densidade ideal 0,60.

Conseguida a densidade ótima, foram colocadas em cada tubo uma carta de identificação Vitek, Gram negativa para bactérias provenientes de inoculação em meio TSA e cartas Gram positivas para bactérias provenientes de inoculação em meio COS.

5.- Resultados e Discussão

O presente estudo teve início com uma pesquisa bibliográfica sobre os métodos analíticos utilizados na determinação de aminas biogénicas em amostras de pescado e produtos de pesca. Em paralelo foi também reunida informação acerca das matrizes mais suscetíveis ao desenvolvimento destes metabolitos assim como os processos para a sua formação.

Deste modo, numa etapa primária, foram efetuados estudos preliminares com o objetivo de se desenvolver uma metodologia de UHPLC que permitisse a correta separação, determinação e quantificação das aminas em estudo.

5.1- Implementação do método analítico:

- Estudos preliminares:

Considerando a norma portuguesa de 2009, “Determinação de Histamina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em produtos de pesca e seus derivados” (Norma Portuguesa 2009) e a norma ISO 19343:2007, “Microbiologia da cadeia alimentar - Detecção e quantificação de histamina em peixes e produtos da pesca - método de HPLC”, bem como os métodos validados no laboratório para determinação e quantificação de aminoácidos em matrizes alimentares (Mota *et al.* 2016), e de Histamina em amostras de pescado e produtos da pesca (Mendes 2018), foi desenvolvido, no presente estudo, um método analítico de cromatografia líquida de ultra pressão, para a quantificação e determinação das aminas biogénicas histamina, putrescina, cadaverina, tiramina e triptamina.

Para tal, foram efetuados cinco ensaios analíticos onde foram variadas as condições cromatográficas gradiente e fluxo de eluição. Na Tabela 5.1 encontram-se presentes as condições estabelecidas para cada ensaio.

Os cinco padrões das aminas em estudo, e o padrão interno, D-norvalina, foram injetados separadamente no equipamento UPLC[®] após derivatização.

Após os ensaios, e de forma a aferir qual a melhor opção para a separação cromatográfica, foram verificados os tempos de retenção das aminas e do padrão interno, analisando para tal a existência de picos co-eluídos, Tabela 5.2.

Tabela 5.1: Gradientes e fluxo

Gradiente - Solventes A e B (%)										
Fluxos	0,5 mL/min						0,7 mL/min			
	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4		Ensaio 5	
Tempo (Min)	A (%)	B (%)	A (%)	B (%)	A (%)	B (%)	A (%)	B (%)	A (%)	B (%)
0,54	99	0,1	99	0,1	99	0,1	99	0,1	99	0,1
5,74	80	20	85	15	85	15	85	15	99	0,1
7,74	50	50	50	50	60	40	40	60	85	15
8	40	60	40	60	40	60	40	60	40	60
8,7	40	60	40	60	40	60	40	60	40	60
10	99	0,1	99	0,1	99	0,1	99	0,1	99	0,1

Tabela 5.2: Tempos de retenção dos ensaios analíticos preliminares

Tempo de retenção das aminas						
	*	1	2	3	4	5
Putrescina		3,43	3,05	3,04	3,04	3,03
Histamina		3,36	3,75	3,82	3,80	3,87
Cadaverina		5,76	6,42	6,39	6,64	6,93
Tiramina		6,00	6,62	6,64	6,53	7,06
Triptamina		7,06	7,32	7,50	7,17	7,60
D-norvalina		5.96	6.59	6.61	6.58	7.04

*Ensaio

Em todas as condições cromatográficas estudadas, não foi possível identificar corretamente o pico da amina tiramina. O tempo de retenção deste metabolito foi sistematicamente coincidente com o tempo de retenção do padrão interno D-norvalina, evidenciando-se a co-eluição dos picos dos dois compostos nos cinco ensaios (Tabela 5.2).

Em detrimento dos ensaios referidos anteriormente, foi necessário recorrer à utilização de outro padrão interno, optando-se pela aquisição do composto 1,7- Diaminoheptano, amplamente citado em estudos científicos, que se referem à determinação de aminas biogénicas através da metodologia de HPLC. Foram repetidas as condições do ensaio 5, com fluxo a 0,7 mL/min e com o gradiente presente na tabela 5.1, usando o padrão 1,7- Diaminoheptano.

Observando o cromatograma, figura 5.1, é possível verificar uma melhoria na resolução, pelo que a utilização do padrão 1,7-Diaminaheptano é mais adequada, quando comparado com o padrão de D-norvalina. Neste caso não se verifica a co eluição de nenhum pico cromatográfico correspondente aos compostos em análise.

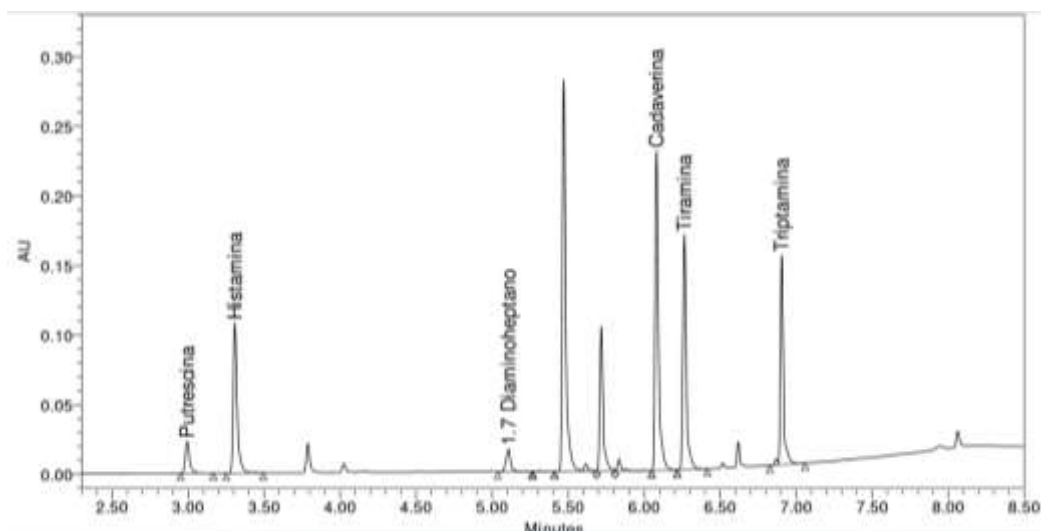


Figura 5.1: Cromatograma onde são utilizadas as condições do ensaio 5 e o padrão 1,7-Diaminoheptano

O sucesso da utilização deste padrão nas condições cromatográficas impostas definiu o método analítico a ser empregue no decorrer do estudo. Assim, as tabelas 5.3 e 5.4 resumem as condições cromatográficas e os tempos de retenção estabelecidos após a otimização do método cromatográfico.

Tabela 5.3: Condições cromatográficas

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0,54	99	0,1
5,74	99	0,1
7,74	85	15
8,00	40	60
8,70	40	60
10,00	99	0,1

Tabela 5.4: Tempo de retenção das aminas biogénicas, nas condições da tabela 5.3

Aminas Biogénicas	Tempo de retenção das aminas
Triptamina	6,90
Tiramina	6,28
Cadaverina	6,09
Putrescina	3,00
Histamina	3,33
1,7-Diaminaheptano	5,12

5.2 - Desempenho do método analítico

Fundamentado nos métodos já validados para a quantificação de aminoácidos e histamina (Motta *et al.* 2016; Mendes 2018), foram definidos parâmetros de critérios de qualidade assentes em parâmetros de validação já definidos em 2.6.

- Gama de trabalho e de linearidade da curva de calibração

Foram definidas as gamas de trabalho e de linearidade das curvas de calibração dos compostos histamina, putrescina, cadaverina, tiramina e triptamina.

Para o efeito, efetuou-se uma master-mix onde foram adicionados volumes iguais dos padrões das aminas em estudo.

A master-mix foi preparada pipetando-se 200 µL de cada padrão de amina, histamina, putrescina, cadaverina, tiramina e triptamina com concentração de 2250 mg/L, preparadas em 4.2.3, para o mesmo tubo.

A construção da curva de calibração teve como molde as concentrações utilizadas nos métodos de quantificação supracitados, quer para a concentração de padrão interno, quer para a concentração de padrões externos, apresentando-se na tabela 5.5 os volumes e as respetivas concentrações dos padrões.

Tabela 5.5: Concentração de cada amina nos pontos estipulados para a curva de calibração

Curva de calibração	Volume de padrão (µL) (a)	Volume de padrão (µL) (b)	Volume HCl (µL)	Concentração (mg/L)
P1	50	180	770	22,5
P2	140	180	680	63,0
P3	230	180	590	103,5
P4	320	180	500	144
P5	400	180	420	180
P6	490	180	330	220,5

(a) Master-Mix

(b) 1,7-Diaminoheptano

O volume de padrão interno adicionado nos pontos definidos para a curva de calibração proveio da diluição da solução mãe preparada em 4.2.3, concentração 52500 mg/L numa razão de 1:100.

Nas Figuras 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6 estão apresentadas as curvas de calibração para as aminas histamina, cadaverina, putrescina, tiramina e triptamina respetivamente, tendo em conta a gama de trabalho referida anteriormente.

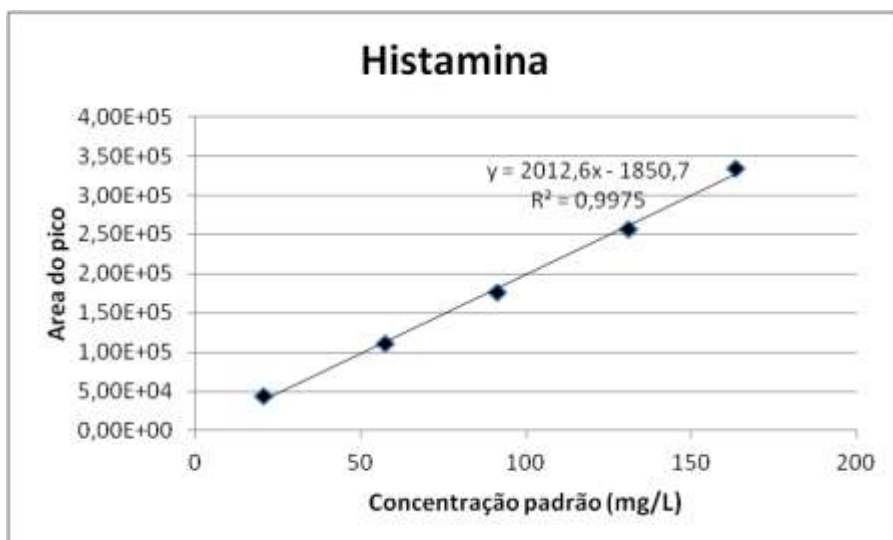


Figura 5.2: Curva de calibração correspondente à amina histamina

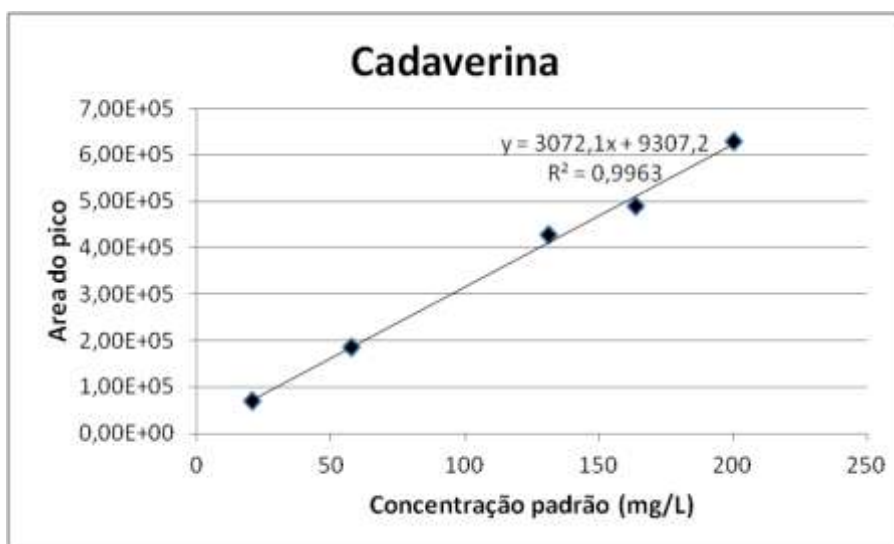


Figura 5.3: Curva de calibração correspondente à amina cadaverina

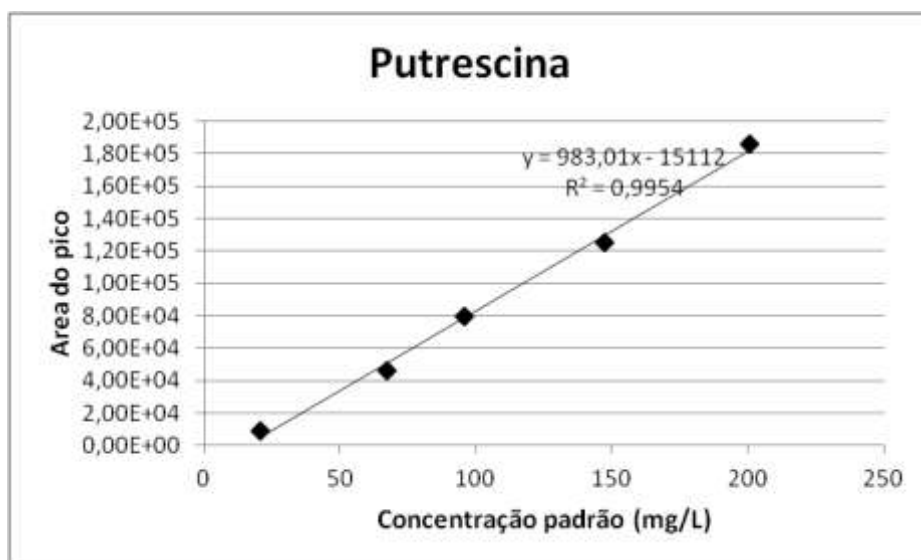


Figura 5.4: Curva de calibração correspondente à amina putrescina

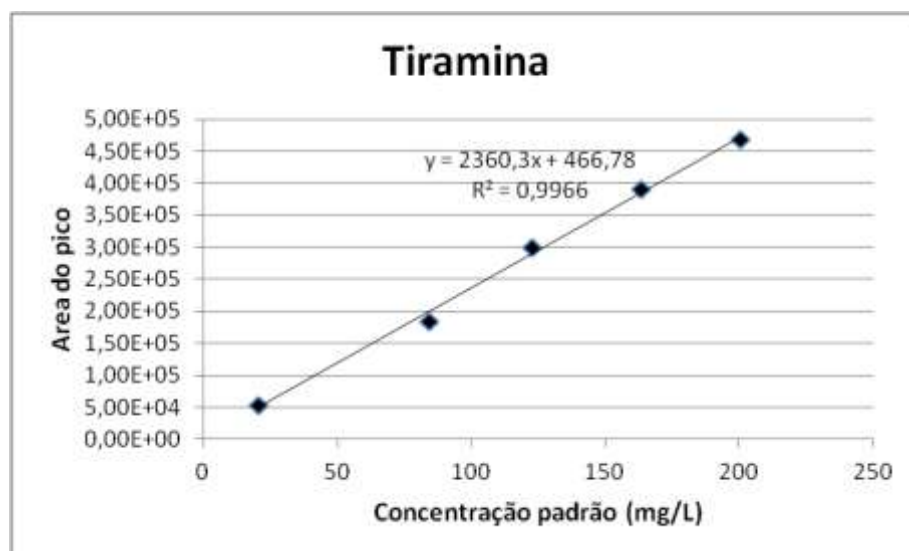


Figura 5.5: Curva de calibração correspondente à amina tiramina

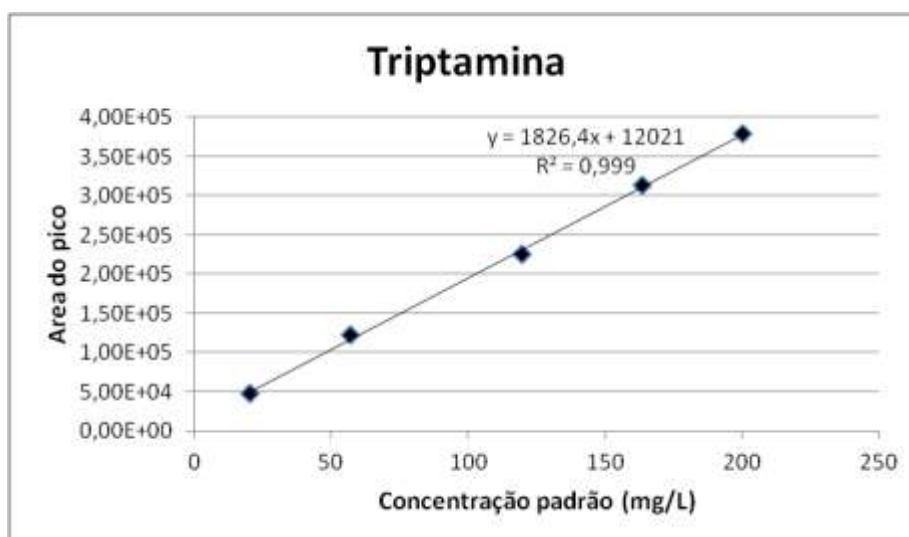


Figura 5.6: Curva de calibração correspondente à amina triptamina

- Critérios de aceitação: Curvas de calibração

A calibração é o processo através do qual é possível relacionar a resposta de um sinal medido por um equipamento e a quantidade de substância conhecida.

O coeficiente de determinação foi calculado para avaliar a calibração analítica, assim como outros parâmetros de análise química, funcionando como critérios de aceitação da curva de calibração.

Na tabela 5.6 estão presentes os critérios calculados para as curvas de calibração de todos os compostos.

Tabela 5.6: Critérios de aceitação da curva de calibração

	Histamina	Cadaverina	Putrescina	Tiramina	Triptamina
Coefficiente de correlação (r)	0,9988	0,9981	0,9999	0,9983	0,9994
Coefficiente de determinação (r²)	0,9975	0,9963	0,9999	0,9966	0,9989
Desvio padrão residual Sy/x	6566	1871	4239	1108	4983
Desvio padrão da curva S	0,3262	0,6089	0,4249	0,4695	0,2728
LD (mg/kg)	0,98	1,86	1,27	1,41	0,81
LQ (mg/kg)	3,26	6,09	4,25	4,70	2,73

Nos métodos cromatográficos, as curvas de calibração devem possuir coeficientes de correlação superiores a 0,995. Como base na tabela 5.6, é possível verificar que os coeficientes de determinação obtidos para as curvas de calibração dos padrões externos são todos superiores a 0,995, sendo aceites no método em estudo, pelo que se revelaram adequadas à quantificação dos analitos.

Assim, em resumo do método desenvolvido na presente dissertação, foram obtidos os tempos de retenção para as aminas biogénicas de 3,33, para a histamina, 6,09 para a cadaverina, 3,00 para a putrescina, 6,28 para a tiramina e 6,90 para a triptamina. O Limite de deteção e de quantificação para as aminas estudadas é respetivamente, 0,98 e 3,26 para a histamina, 1,86 e 6,09 para a cadaverina, 1,27 e 4,25 para a putrescina, 1,41 e 4,70 para a tiramina e por último 0,81 e 2,73 para a triptamina. A gama de recuperação ao padrão foi estipulada entre 60%-120%, consoante a gama de trabalho, Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro 2006, e estipulando-se o intervalo de aceitabilidade 0-30 para o coeficiente de variação.

5.3-Análise de aminas biogénicas em amostras de atum fresco e em conserva por cromatografia líquida de ultra pressão

As amostras AF1, AF2, AF3, referentes à matriz atum fresco, e C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8, referentes à matriz atum em conserva, foram processadas e analisadas de acordo com o procedimento descrito anteriormente em Materiais e métodos.

Na tabela 5.7 e na tabela 5.8 encontram-se os valores obtidos para a concentração de histamina, putrescina e cadaverina nas amostras de atum fresco e atum em conserva, respetivamente. Os coeficientes de variação também se encontram presentes nas tabelas mencionadas, assim como as recuperações calculadas.

As aminas tiramina e triptamina ficaram abaixo do limite de quantificação nas matrizes acima referidas.

Tabela 5.7: Concentração das aminas histamina, cadaverina e putrescina em amostras de atum fresco.

Aminas Biogénicas										
Amostras	Tempo	Histamina	CV (%)	Rec (%)	Putrescina	CV (%)	Rec (%)	Cadaverina	CV (%)	Rec (%)
Atum 1 (AF1)	T0	<LQ	-	137	287,0 ± 58,7	20,5	115	<LQ	-	145
	T1	11,00 ± 1,41	12,9		1263 ± 64	5,10		<LQ	-	
	T2	32,50 ± 9,19	28,3		2423 ± 207	8,55		<LQ	-	
	T3	1544 ± 83	5,40	111	2602 ± 71	27,2	140	979,0 ± 224,0	22,9	75,9
Atum 2 (AF2)	T0	219,0 ± 16,2	7,40	115	684,0 ± 27,6	4,03	62,9	<LQ		141
	T1	300,0 ± 82,2	27,4		779,0 ± 226,0	29,0		<LQ	-	
	T2	460,0 ± 95,0	20,7		833,0 ± 17,7	2,12		<LQ	-	
	T3	746,0 ± 80,7	10,8	79,4	1068 ± 98	9,14	64,1	<LQ	-	84,4
Atum 3 (AF3)	T0	<LQ	-	148	143,0 ± 38,3	26,8	160	418,0 ± 4,6	109	180
	T1	<LQ	-		297,0 ± 12,7	4,29		893,0 ± 77,7	8,70	
	T2	47,40 ± 9,87	20,8		371,0 ± 22,2	6,91		1008 ± 52	5,16	
	T3	133,0 ± 9,5	6,90	123	2010 ± 24	6,81	63,0	1044 ± 72	6,92	197

Resultados expressos em mg/kg

*T0 = 0h, T1= 24h, T2= 48h, T3= 120h.

Por amostra e por corrida cromatográfica foram efetuadas duas adições de padrão para o cálculo da recuperação, tendo sido escolhidas as amostras onde se previam encontrar as menores e as maiores concentrações de aminas biogénicas, correspondendo ao T0, 0h, e ao T3, 120h.

As recuperações foram aceites no intervalo compreendido entre 60% e 120%, considerando o regulamento da comunidade europeia Nº 401/2006 de 23 de Fevereiro de 2006, referente aos métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios, sendo o intervalo concordante com a gama de trabalho em estudo.

Na tabela 5.7, referente à amina histamina, quer a amostra AF1, às 0h, quer a amostra AF3, às 0 e 120h, apresentam recuperações de padrão não aceitáveis, fora do intervalo 60%-120%. O mesmo é notório para a amina putrescina nas amostras AF1 e AF3 às 120h e às 0h, respetivamente, e para a amina cadaverina nas amostras AF1 em 0h, AF2 em 0h e AF3 em 0h e em 120h.

Os picos cromatográficos das amostras às 0h, que não apresentaram valores de recuperação dentro do limite de aceitação, apresentam áreas cromatográficas inferiores à do pico correspondente ao primeiro ponto da curva P1 (22,5 mg/L), limite mínimo da gama de trabalho e de linearidade, T0 < P1.

Porém, nas amostras correspondentes ao T3, 120h de refrigeração, verificou-se precisamente o contrário, as áreas dos picos cromatográficos correspondentes às amostras foram superiores às áreas do pico correspondente ao último ponto da curva P6 (220,5 mg/L), máximo da gama de trabalho e de linearidade, T3 > P6.

Como os valores se verificaram fora da curva de calibração não é possível quantificar corretamente a concentração das aminas presentes na amostra tornando-se também

impossível determinar com fidedignidade a recuperação ao padrão interno através do método de adição de padrão interno, por falta de linearidade nos resultados.

Estabelecido o intervalo de aceitação do cálculo da recuperação de padrão, para que exista precisão nos resultados, o valor do coeficiente de variação tem que ser inferior a 30, de acordo com o proposto pela Comissão Europeia (European Commission 2002).

Como todos os resultados apresentaram um coeficiente de variação inferior a 30 todos os resultados foram aceites, inclusive os que se encontravam fora da gama de trabalho.

Por último, na tabela 5.8, encontram-se os valores obtidos para a concentração de Histamina, Putrescina e Cadaverina, nas amostras C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8. Os respetivos coeficientes de variação também se encontram presentes na tabela mencionada, assim como as recuperações calculadas.

Tabela 5.8: Concentração das amins histamina, cadaverina e putrescina em amostras de atum em lata.

Amostras	Amins Biogénicas								
	Histamina	CV (%)	Rec (%)	Putrescina	CV (%)	Rec (%)	Cadaverina	CV (%)	Rec (%)
C1	466,0 ± 36,1	26,1	62,5	2422 ± 95	3,94	119	<LQ	-	126
C2	521,0 ± 43,1	23,1		1613 ± 83	5,17		<LQ	-	
C3	338,0 ± 5,7	5,66		2225 ± 94	4,21		24,50 ± 12,00	12,0	
C4	406,0 ± 62,2	22,2		2844 ± 32	1,14		52,80 ± 3,56	3,56	
C5	32,60 ± 8,41	8,41	118	648,0 ± 58,0	8,95	98,4	<LQ	-	142
C6	228,0 ± 2,1	2,12		1392 ± 199	14,3		<LQ	-	
C7	215,0 ± 27,6	27,6		2244 ± 79	3,53		41,20 ± 6,83	6,83	
C8	169,0 ± 19,9	19,9		1958 ± 242	12,4		42,40 ± 8,63	8,63	

Resultados expressos em mg/kg

Também no ensaio analítico referente às conservas de atum, foram efetuadas só duas amostras com adição de padrão pois tratou-se de uma análise simultânea do mesmo tipo de matriz. Das oito conservas em análise foram selecionadas, com base num ensaio prévio, aquelas onde seria espetável obter a concentração máxima, C1, e a concentração mínima, C5, de amins biogénicas.

Considerando novamente o intervalo de aceitabilidade 60%-120% de recuperação ao padrão interno, e tendo como base a tabela 5.8 é possível referir que as amins histamina e putrescina, quer em C1, quer em C5, apresentaram percentagens de recuperação dentro do limite estipulado para a gama de trabalho em estudo.

A amina cadaverina não apresentou percentagens de recuperação aceitáveis quer na amostra C1, quer na amostra C5, tendo-se verificado que as áreas dos picos correspondentes são inferiores à área do ponto P1 (22,5 mg/L) da curva de calibração (limite inferior da gama de linearidade). Assim, a falta de linearidade nestas amostras não permite o cálculo fidedigno da concentração das amins em estudo, o que inflaciona a recuperação de padrão.

Tendo como valor máximo de coeficiente de variação 30, todos os resultados foram aceites por concordância com o intervalo de aceitabilidade, mesmo os que apresentaram percentagens de recuperação incorretas.

5.4-Análise de amins biogénicas em amostras de camarão: Estudo preliminar

Neste ensaio foram aplicadas as mesmas condições definidas para a matriz de atum fresco, submissão a um período de refrigeração compreendido entre 0h, 24h, 48h e 120h a 3 ± 2 °C e posterior identificação e quantificação das amins biogénicas presentes, assim como deteção de bactérias produtoras destes metabolitos azotados.

Os teores de microrganismos presentes nas amostras de camarão encontram-se na figura 5.7.

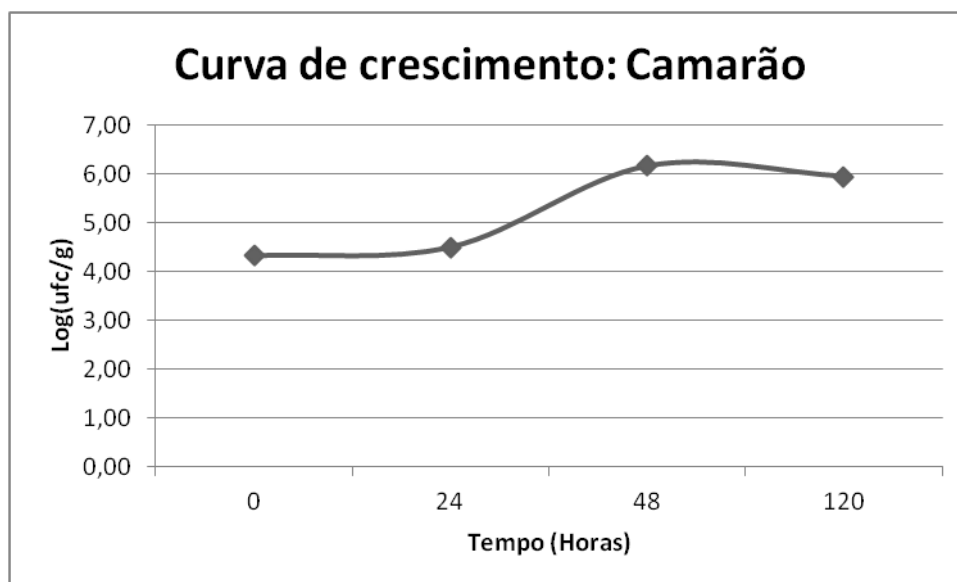


Figura 5.7: Curva de crescimento correspondente às amostras de camarão, T0= 0h, T1= 24h, T2= 48h, T3= 120h.

Considerando a figura acima é de notar que o valor de microrganismos presente na matriz sofreu um aumento, uma vez que às 0h o valor das unidades formadoras de colónia por g, é de 4,5 ufc/g e às 120h é de 6,17 ufc/g.

A identificação destes microrganismos apresenta-se listada na tabela 5.9.

Tabela 5.9: Bactérias identificadas na amostra de camarão

Camarão
<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Aeromonas salmonicida</i>
<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Lactococcus garvieae</i>
<i>Pantoea</i> spp
<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Rhizobium radiobacter</i>
<i>Shewanella algae</i>
<i>Shewanella putrefaciens</i>
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

Com base na tabela A.1 presente no Anexo, é possível caracterizar as bactérias *Acinetobacter lwoffii*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Shewanella putrefaciens* e *Vibrio cholerae*, como produtoras de histamina, putrescina e cadaverina.

Os resultados obtidos neste estudo preliminar foram produzidos nas mesmas condições do estudo nos atuns, assim será considerado para uma breve comparação.

Na tabela 5.10 encontram-se os resultados da quantificação cromatográfica das aminas histamina, putrescina e cadaverina na amostra de camarão analisada.

Tabela 5.10: Concentração das aminas histamina, cadaverina e putrescina em amostras de camarão de aquacultura.

Aminas Biogénicas										
Amostras	Tempo	Histamina	CV(%)	Rec	Putrescina	CV (%)	Rec	Cadaverina	CV(%)	Rec
Camarão	T0	1143 ± 22	19,6	100,2	980,1 ± 21,5	21,3	112,2	127,0 ± 28,6	22,5	102,5
	T1	1836 ± 34	18,5		1285 ± 22	16,7		158,0 ± 34,6	21,9	
	T2	2049 ± 47	23,1		1622 ± 43	26,7		202,0 ± 55,9	27,8	
	T3	3790 ± 67	17,7	150,0	2498 ± 45	18,1	113,2	578,0 ± 135,3	23,4	80,3

Resultados expressos em mg/kg

Considerando os valores acima tabelados é possível constatar que, com exceção do tempo T3 para a amina histamina, o cálculo da recuperação ao padrão encontra-se dentro do limite considerado, 60%-120%.

O motivo da amostra T3 se encontrar acima do valor máximo de aceitação é idêntico ao verificado nas amostras de atum, a concentração da amina histamina encontra-se fora da gama de linearidade definida para o estudo, pelo que, para a correta quantificação, este ensaio deveria ser repetido com uma toma de amostra mais pequena (exemplo 1 g).

5.5-Análise microbiológica amostras de atum fresco e em conserva

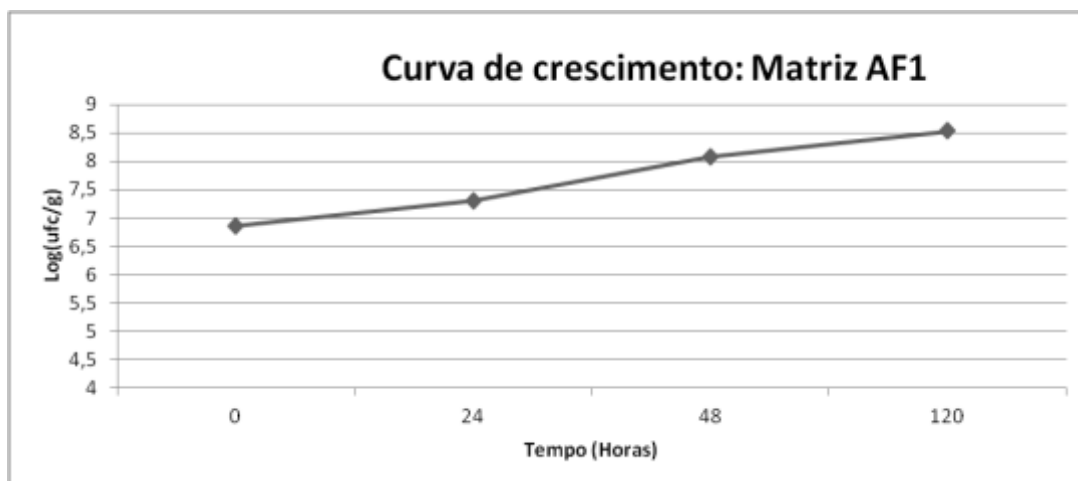


Figura 5.8: Curva de crescimento microbológico referente à amostra de atum fresco AF1

T0= 0h, T1= 24h, T2= 48h, T3= 120h.

Em paralelo aos ensaios químicos, foram efetuados ensaios microbiológicos referidos em 4.3.3 a 4.3.5. Os teores de microrganismos obtidos para as amostras de atum fresco encontram-se nas figuras 5.8, 5.9 e 5.10.

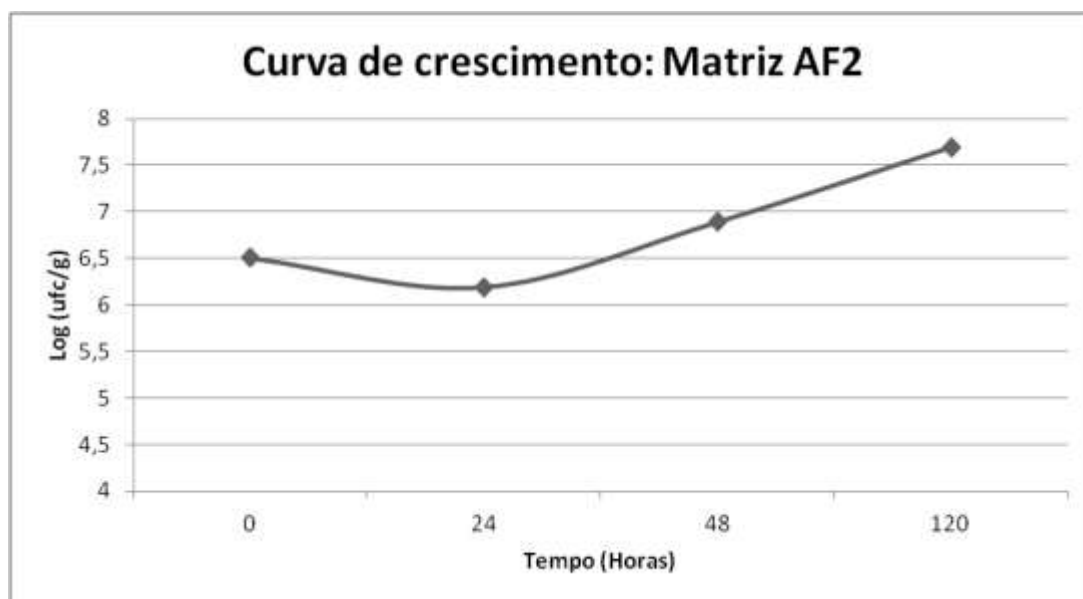


Figura 5.9: Curva de crescimento microbológico referente à amostra de atum fresco AF2

T0= 0h, T1= 24h, T2= 48h, T3= 120h.

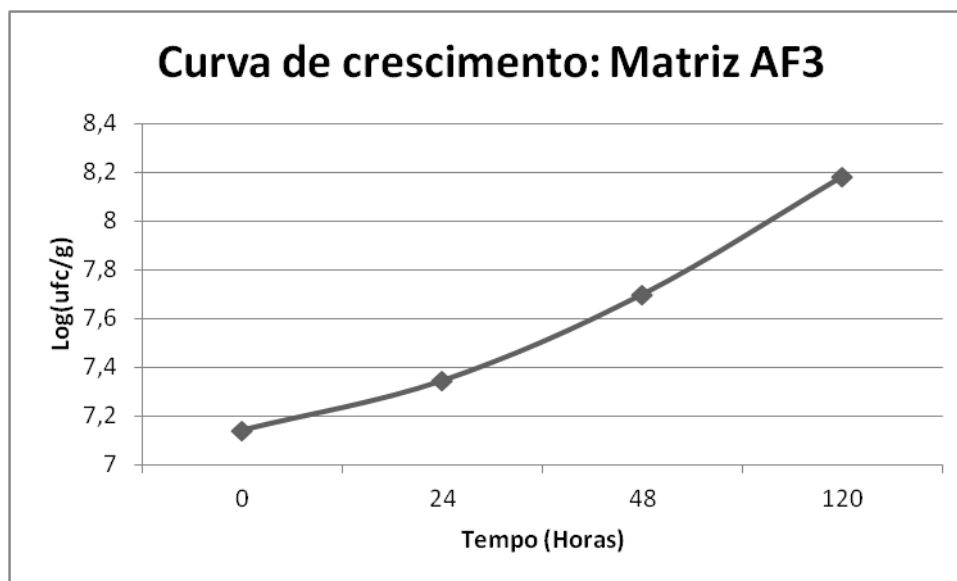


Figura 5.10: Curva de crescimento microbiológico referente à amostra de atum fresco AF3.
T0= 0h, T1= 24h, T2= 48h, T3= 120h.

Partindo da análise das figuras enumeradas anteriormente é possível verificar que em todas as amostras de atum existiu um aumento do teor de microrganismos entre as 0h e as 120h.

Contudo é notório na figura 5.9, referente à matriz AF2, um decréscimo da curva entre as 0h e as 24h. Esse decréscimo pode ser atribuído à ambientação da flora microbiana às condições de análise, $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$, uma vez que as 0h correspondem ao dia de aquisição do produto, e as 24h correspondem ao primeiro dia, 24h, de refrigeração. A diminuição da temperatura pode ter influenciado o crescimento microbiano existindo bactérias em fase de latência, adaptação.

A amostra AF1, figura 5.8, é aquela que revela um número mais elevado de unidades formadoras de colónia por g, 8,53 log ufc/g, traduzindo-se na amostra com mais carga microbiana no término do ensaio.

Em contrapartida a amostra AF2, figura 5.9, é aquela que possui menos carga microbiana apresentando apenas 7,69 log ufc/g às 120h.

Apesar da amostra AF1 possuir um valor de ufc/g superior às restantes amostras, o atum fresco AF3, figura 5.10, é aquele que revela um maior aumento do número de microrganismos ao longo do tempo de estudo, iniciando a contagem, às 0h, com 7 log ufc/g e terminando às 120h com 8,18 log ufc/g. Este fenómeno pode ser concordante com uma população de microrganismos com a capacidade de crescimento a temperaturas abaixo dos 10°C , permitindo o seu desenvolvimento na amostra em refrigeração.

A flora microbiana presente nas restantes amostras pode ser constituída principalmente por microrganismos que não possuem a capacidade de crescer em temperaturas de refrigeração, podendo levar à diminuição da população microbiana ou a períodos de adaptação, quando colocadas em condições adversas ao seu crescimento.

As colônias presentes nas contagens correspondentes às maiores diluições de amostra foram selecionadas por morfologia, cor, brilho e tamanho com o intuito de identificar a maior variedade de microrganismos presentes nas amostras.

Na tabela 5.11 estão listadas as bactérias encontradas nas matrizes AF1, AF2 e AF3 respectivamente.

Tabela 5.11: Microrganismos identificados na amostra de atum fresco

AF1	AF2	AF3
<i>Acinetobacter denitrificans</i>	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i>
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Moellerella wisconsensis</i>	<i>Lelliottia amnigena</i> 1
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Morganella morganii</i> subsp <i>sibonii</i>	<i>Morganella</i> subsp <i>morganii</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pantoea</i> spp	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>
<i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Serratia liquefaciens</i>		<i>Serratia marcescens</i>
<i>Shewanella putrefaciens</i>		
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		

Nas três amostras em estudo existe concordância nos microrganismos detetados ao longo do período do estudo, não obstante os diferentes locais de aquisição.

Microrganismos como as bactérias *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens* *Morganella morganii* e *Hafnia alvei* estão presentes em AF1, AF2 e AF3 sendo características de matrizes alimentares em deterioração.

As bactérias anteriormente mencionadas encontram-se amplamente referenciadas, (Leisner *et al.* 2002; Pereira 2014; Tembhurne *et al.* 2013) em estudos inerentes à produção de compostos amina, como bactérias produtoras de enzimas descarboxilases que originam maioritariamente aminas como a histamina, a putrescina e a cadaverina, Tabela A.1, presente no Anexo.

A estirpe bacteriana *Acineobacter* também foi identificada nas três matrizes estudadas, AF1, AF2 e AF3. Estas bactérias Gram negativas não apresentam caráter patogénico em indivíduos saudáveis, contudo, em indivíduos com o sistema imunitário debilitado podem causar graves infeções pulmonares de difícil tratamento, uma vez que esta estirpe tem vindo a tornar-se cada vez mais resistente aos antibióticos (Oliveira, 2007).

Nas amostras de atum em conserva, C5 e C7, tabela 5.12, foi detetado o microrganismo *Staphylococcus epidermidis* enunciado na literatura como produtor de histamina, Tabela A.1 presente no Anexo.

Na amostra C1, C2, C5 e C6 foi detetada a presença da bactéria *Staphylococcus warneri* e em C3 a bactéria *Staphylococcus hominis*. Nas amostras C4 e C8 não foi detetada a presença de microrganismos, tabela 5.12.

Considerando o processo de fabrico das latas em conserva, em que a matriz é fechada crua dentro da conserva e tratada termicamente apenas aquando o processo de esterilização, era esperado que fossem identificadas bactérias produtoras de esporos nas matrizes compreendidas entre C2 e C8, tal fenómeno não foi comprovado. Contudo na amostra C1 foi detetado *Bacillus cereus*, bactéria que além de possuir a capacidade de produzir esporos produz também toxinas (Mendes *et al.* 2011).

Nos ensaios efetuados em condições de anaerobiose, em caldo de tioglicolato, não se verificou o crescimento de microrganismos anaeróbios.

Tabela 5.12: Microrganismos detetados nas amostras de atum em conserva C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8.

Conservas	Microrganismos
C1	<i>Staphylococcus warneri</i> <i>Bacillus cereus</i>
C2	<i>Staphylococcus warneri</i>
C3	<i>Staphylococcus hominis</i>
C4	-
C5	<i>Staphylococcus warneri</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
C6	<i>Staphylococcus warneri</i>
C7	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
C8	-

Procedendo agora à discussão mais pormenorizada do estudo desenvolvido no presente trabalho, as figuras 5.11, 5.12 e 5.13 traduzem a relação entre os resultados obtidos nos ensaios químicos de quantificação das aminas biogénicas, e os resultados obtidos nos ensaios microbiológicos de quantificação da flora microbiana, anteriormente apresentados.

O atum, como já referido anteriormente, é um peixe rico em histidina, possuindo uma capacidade elevada de acumulação do metabolito histamina no interior do seu músculo, contudo o número de horas que é necessário para que ocorra a quantificação do composto aminado depende do acondicionamento e das condições de conservação impostas nas superfícies de aquisição.

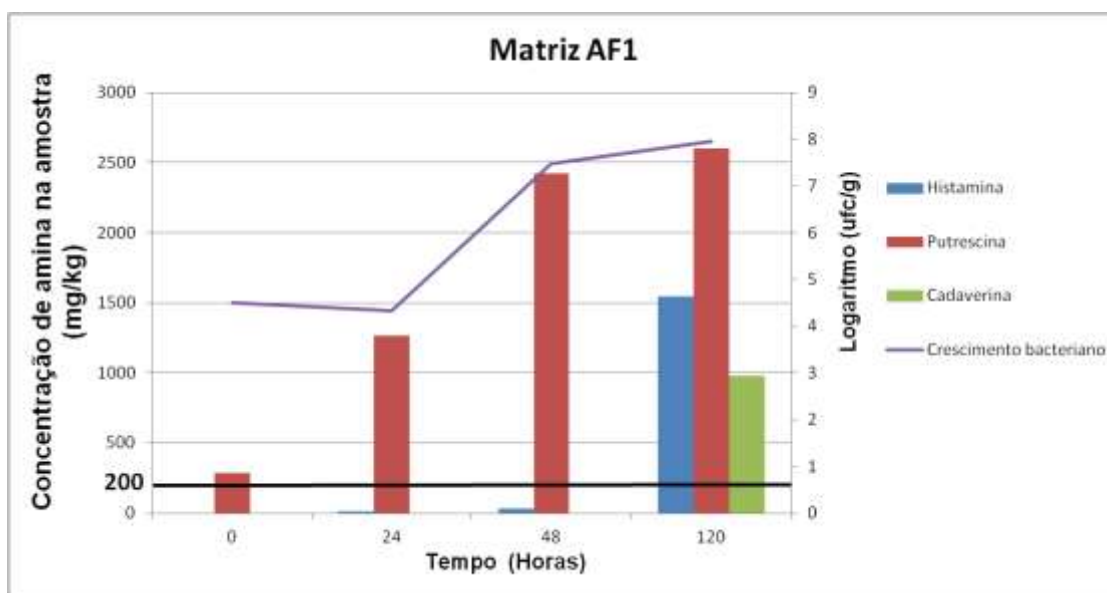


Figura 5.11: Relação entre a concentração de amins biogénicas, em mg/kg, e a população microbiana presente no atum fresco 1.

Na amostra AF1, como é possível verificar na figura 5.11 e na tabela 5.7, a amina histamina apenas é detetada a partir das 24h de refrigeração, apresentando uma concentração de 11 mg/kg. Ao longo do ensaio a concentração desta amina foi aumentando, verificando-se para as 48h e para as 120h uma concentração de 32,5 mg/Kg e 1544 mg/kg, respetivamente. Para as restantes amins, putrescina e cadaverina, também foi verificado um aumento de concentração ao longo de todo o ensaio, obtendo-se às 0h uma concentração de 287 mg/kg, às 24h uma concentração de 1263 mg/kg, às 48h uma concentração de 2423 mg/kg e às 120h um valor de 2602 mg/kg, para a amina putrescina. Em contrapartida a amina cadaverina apenas foi quantificada às 120h de refrigeração apresentado um valor de 979 mg/kg.

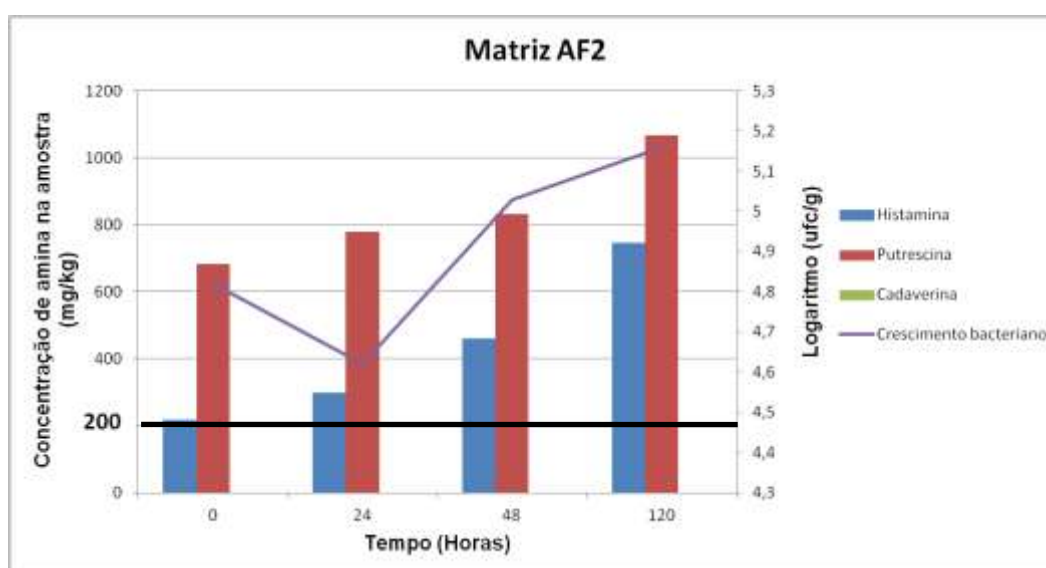


Figura 5.12: Relação entre a concentração de amins biogénicas, em mg/kg, e a população microbiana presente no atum fresco 2.

Na amostra AF2, como é observável na figura 5.12 e na tabela 5.7, às 0h já é possível quantificar a amina histamina, obtendo-se um valor de 219 mg/kg. Concordante com o espectável, foi verificado um aumento sucessivo da concentração deste metabolito, detetando-se 300 mg/kg às 24h, 460 mg/kg às 48h, e 746 mg/kg às 120h. Também para a amina putrescina se verifica um aumento sistemático da concentração, quantificando-se 684 mg/kg às 0h de refrigeração, 779 mg/kg às 24h, 833 mg/kg às 48h e 1068 mg/kg às 120h de refrigeração. A amina cadaverina não foi detetada ao longo do ensaio em nenhum tempo de análise.

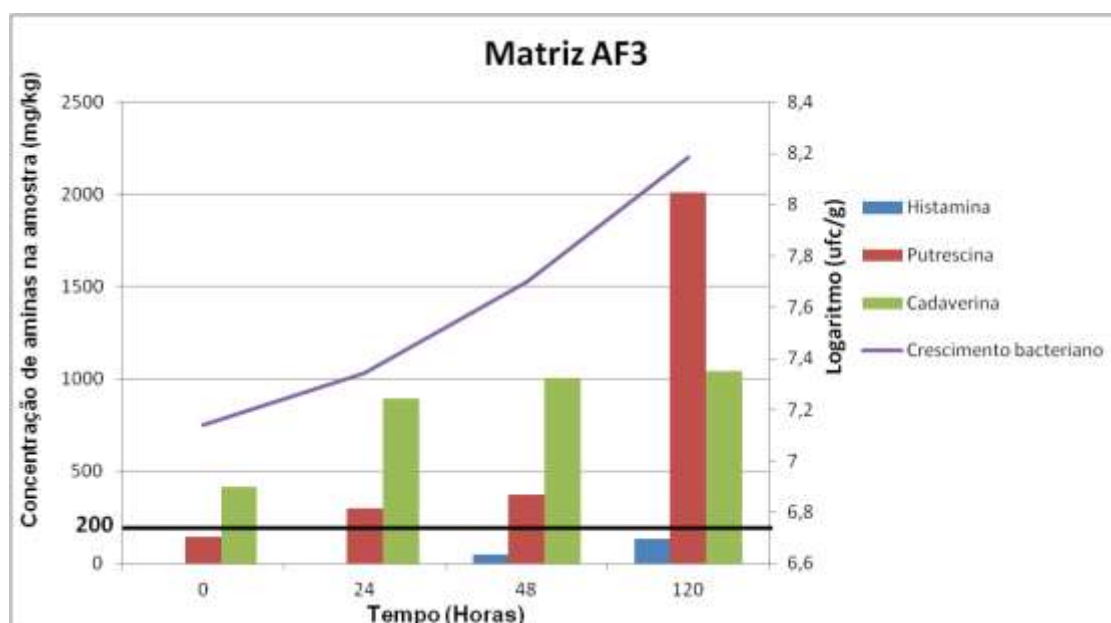


Figura 5.13: Relação entre a concentração de amins biogénicas, em mg/kg, e a população microbiana presente no atum fresco 3.

Por ultimo, na amostra AF3, considerando a figura 5.13 e a tabela 5.7, a concentração de histidina apenas é quantificável a partir de das 48h, apresentando uma concentração de 47,4 mg/kg. Ao longo do ensaio foi verificado um aumento da concentração de histamina atingindo-se o valor 133 mg/kg às 120h. A amina Putrescina, contrariamente à histamina, é detetada no início do estudo e sofre um aumento contínuo ao longo do ensaio, às 0h de refrigeração esta amina apresenta a concentração de 143 mg/kg, aumentando para 297 mg/kg com 24h, para 371 mg/kg com 48h e ainda para 2010 mg/kg com 120h de refrigeração. Nesta amostra de atum a amina cadaverina apresenta um aumento bastante superior ao verificado nas restantes amostras de atum, sendo possível quantificar 418 mg/kg às 0h, 893 mg/kg às 24h, 1008 mg/kg às 48h e 1044 mg/kg às 120h de ensaio.

Em Olivo 2013 os resultados obtidos na quantificação de amins biogénicas apresentam disparidade quando comparados com os resultados obtidos no presente estudo. O trabalho deste autor revela concentrações de putrescina cadaverina e histamina determinadas

em amostras de atum armazenadas em gelo, pós captura. Estas amostras foram recolhidas em embarcações em alto mar e colocadas imediatamente em gelo por tempo indefinido. Os valores de aminas biogénicas obtidos neste estudo são de 21,35 mg/kg para a amina putrescina, 18,12 mg/kg para a amina cadaverina e 13,99 mg/Kg para a amina histamina.

De acordo com Prester, 2011 e Rossano *et al.*, 2006 a temperatura de armazenamento é um fator crucial no desenvolvimento de aminas biogénicas. Segundo os estudos destes autores em amostras de anchovas, armazenadas a 20°C durante 24h, a concentração de histamina é setenta vezes superior à concentração desta amina em amostras armazenadas a 10°C durante o mesmo período de tempo. As anchovas apresentam valores de 750 mg/kg, aos 20°C de armazenamento e 11 mg/kg aos 10°C de armazenamento. Em concordância Ozogul, 2006, analisou amostras de sardinhas armazenadas durante 15 dias a $3 \pm 2^\circ\text{C}$, obtendo uma concentração de histamina de 203 mg/kg, bastante inferior à concentração obtida por Rossano, por utilizar uma temperatura de armazenamento inferior.

Por conseguinte, para a temperatura de refrigeração utilizada no presente trabalho, $3 \pm 2^\circ\text{C}$, não seria espectável a quantificação de uma concentração elevada destes metabolitos nos períodos 0h, 24h e 48h, uma vez que temperaturas entre os 25°C e os 35°C são mais favoráveis à produção destes compostos.

Contudo, como as amostras foram recolhidas de grandes superfícies comerciais, não é possível controlar nem conhecer os manuseios e as condições de armazenamento, não sendo possível estabelecer uma relação fidedigna com os resultados obtidos após captura, nem com os resultados obtidos para matrizes diferentes das quais também não se possui o controlo das condições pré-ensaio.

Atualmente, o regulamento (CE) N.º 2073/2005 e consequentes atualizações, estabelece um limite máximo apenas para a concentração da amina histamina em produtos provenientes da pesca. Deste modo, encontra-se definido no ponto 1.26 no Anexo 1 do regulamento supracitado, o valor máximo de 200 mg/kg para peixes associados a um teor de histidina elevado.

Em concordância com o limite máximo estabelecido para a concentração de histamina no pescado, é possível afirmar que, com exceção da amostra AF2, todas as restantes amostras não excedem o valor de 200 mg/kg às 0h, dia de aquisição. A amostra AF2 ao tempo 0h apresenta uma concentração de histamina de 219 mg/kg, ultrapassando o limite considerado máximo para o teor de histamina no pescado. Todavia, não é possível aplicar a norma estabelecida no artigo 14.º do Regulamento (CE) Nº 178/2002 ao abrigo da qual se deve partir do princípio de que, se existir um produto do lote inapropriado para consumo, todos os produtos desse lote serão inapropriados, para tal seriam necessárias analisar um total de nove tomas de amostra provenientes do mesmo lote (Parlamento Europeu e do Conselho 2002).

Em contra partida as concentrações de histamina determinadas para as conservas C1, C2, C3 e C4 apresentam valores bastante superiores ao estipulado no regulamento supracitado, sendo quantificadas concentrações de 466,0 mg/kg, 521,0 mg/kg, 338,0 mg/kg, 406,0 mg/kg, respetivamente. Estes valores são semelhantes com os obtidos no estudo de

(Mendes 2018), onde foi determinada a concentração da amina histamina em amostras de atum em conserva ao natural e em amostras de paté de atum, sardinha e camarão. Os valores de histamina mais elevados descritos neste estudo, para as conservas de atum ao natural, são de 401 mg/kg e 432 mg/kg, contudo também foram determinados valores de 197 mg/kg, 172 mg/kg, 91,4 mg/kg, 93,4 mg/kg, inferiores ao limite máximo legislado. Em Araújo *et al.*, (2004) também foram determinadas as concentrações de histamina em conservas de atum ao natural e em conservas de atum em óleo, encontrando-se descritas concentrações de 928,82 mg/kg, 255,58 mg/kg, 111,35 mg/kg em atuns conservados em óleo e de 1023,16 mg/kg, 224,09 mg/kg e 118,15 mg/kg para atuns conservados em água. Segundo os autores supracitados as concentrações de histamina entre os diferentes tipos de conservação, em óleo e em água, não diferem significativamente podendo ainda considerar-se que não existe diferença entre o consumo de atum em óleo e o consumo de atum em água, no que diz respeito à concentração da amina histamina.

A disparidade dos teores de histamina obtidos nas conservas de atum pode estar relacionada com a qualidade da matéria-prima, quanto mais avançado o estado de deterioração do produto selecionado para processamento, maior a concentração destas aminas no produto final. Contudo também pode estar relacionada com más práticas de fabrico ao longo do processo de produção, como falta de higiene e armazenamento a temperaturas incorretas.

Atendendo agora às figuras 5.11, 5.12 e 5.13 é possível estabelecer uma relação entre a curva de crescimento microbiano e a concentração de aminas presente nas amostras de atum fresco.

Na amostra AF1 é de notar uma ligeira diminuição, do crescimento microbiológico, das 0 para as 24 horas, o que pode corresponder a um período de adaptação da flora microbiana à temperatura de refrigeração de $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Segundo (Nicolau 2014), existe uma fase inicial de crescimento microbiológico, designada de fase de latência, em que as células adaptam o seu metabolismo às novas condições que lhes são impostas. A duração desta fase de adaptação varia com a condição em que se encontra o microrganismo e com as características do novo meio onde se encontra, sendo depois procedida por uma fase de crescimento exponencial. Em concordância, é verificado um aumento significativo de microrganismos entre as 24h e as 48h, voltando a aumentar ligeiramente entre as 48h e as 120h.

Ao longo das várias fases que caracterizam o crescimento microbiológico a concentração de aminas vai geralmente aumentando conforme o tipo de microrganismo e/ou carga microbiana. Em AF1, quando as bactérias presentes na matriz em estudo entram em fase de latência, a única amina produzida é a putrescina que não varia expressivamente ao longo da fase de latência, contudo após a fase exponencial é de constatar que a concentração de putrescina atinge o valor máximo do ensaio. O valor de putrescina, histamina e cadaverina, às 120h de refrigeração, é superior ao valor das mesmas aminas em qualquer outro tempo ponderado para o ensaio, embora as células já estejam a entrar numa fase estacionária, os

metabolitos libertados na matriz já se encontram acumulados. O mesmo é notório para as amostras AF2 e AF3.

As *Enterobacteriaceae*, responsáveis pela produção da grande maioria das amins biogénicas, são bactérias mesófilas que também se conseguem desenvolver à temperatura de 10°C, no entanto a 5°C a sua proliferação é retardada (FAO 1997). Não obstante, após 24h de refrigeração, é verificada a fase exponencial de crescimento, aumentando consideravelmente o número de microrganismos e a concentração de amins biogénicas produzidas. Mais uma vez às 120h, atingem-se os valores máximos de concentração para as amins histamina e putrescina.

Nas amostras AF1 e AF3 a amina histamina apenas é produzida na fase exponencial da curva de crescimento, enquanto que na amostra AF2 já existe produção de histamina em T0, este fenómeno pode dever-se às condições de manipulação a que o pescado foi sujeito antes de ser comercializado. Em relação à amina putrescina, esta está presente em todas as fases do crescimento microbiano, acumulando-se na matriz ao longo do ensaio.

Em análise aos microrganismos *Pseudomonas putrefaceans*, *Serratia liquefaciens*, *Morganella morganii* e *Hafnia alvei* detetados concordantemente em todas as amostras AF1, AF2 e AF3, são amplamente descritos na literatura como bactérias produtoras de amins, especialmente histamina. No estudo de Takahashi *et al.*, 2003, a *Morganella morganii* foi descrita como a principal bactéria produtora de histamina, assim como, Flick and Granata 2005 que referiu não só a *Morganella* spp., como *Hafnia alvei* e a *Klebsiella* spp. A bactéria *Staphylococcus epidermis* encontrada nas amostras, C5 e C7 foi descrita (Judas 2000), como sendo uma bactéria produtora de histamina, putrescina e β -feniletilamina.

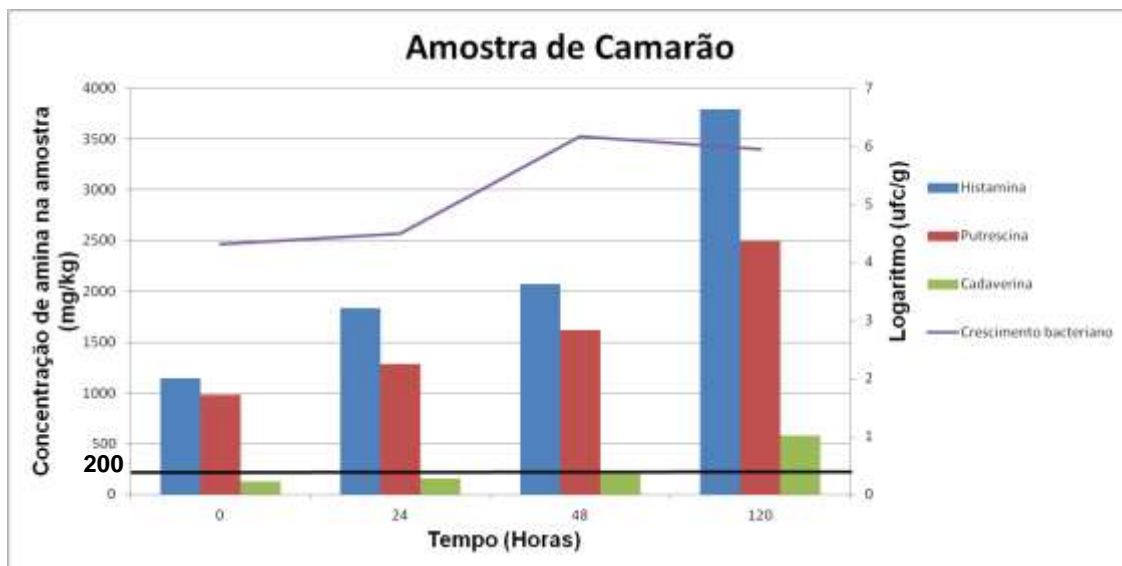


Figura 5.14: Relação entre a concentração de amins biogénicas, em mg/kg, e a população microbiana presente na amostra camarão de aquacultura

Nas amostras de camarão as aminas histamina, putrescina e cadaverina também aumentaram ao longo do ensaio. O metabolito histamina, ao tempo 0h, apresenta uma concentração de 1143 mg/kg, bastante superior às concentrações de histamina determinadas para as amostras de atum ao mesmo tempo de análise, 0 mg/kg para AF1 e AF3 e 219 mg/kg na amostra AF2. A amina putrescina também apresenta uma concentração mais elevada nas amostras de camarão comparativamente às amostras de atum fresco, quantificando-se uma concentração de 980 mg/kg, às 0h de refrigeração, nas amostras de camarão e de 287 mg/kg, 684 mg/kg e 143 mg/kg para amostras AF1, AF2 e AF3 respetivamente. A concentração de cadaverina detetada para ambas as amostras é, contrariamente ao sucedido nas outras aminas, inferior nas amostras de camarão. Nas amostras de atum, AF1 e AF2, não foi possível quantificar este metabolito às 0h de refrigeração, encontrando-se inferior ao limite de quantificação, contudo, na amostra AF3 a concentração de cadaverina apresenta valores de 418 mg/kg às 0h de refrigeração, valor que é superior à concentração determinada na amostra de camarão, 127,0 mg/kg, ao mesmo tempo de refrigeração, 0h.

O valor máximo de histamina determinado na amostra de camarão ocorreu ao tempo 120h, e foi de 3790 mg/kg, o mesmo foi verificado para as restantes aminas, 2498 mg/kg para a putrescina e 578 mg/kg para a amina cadaverina.

Considerando as tabelas 5.7, 5.8, 5.9 e as figuras 5.11, 5.12, 5.13 e 5.14 é possível aferir que o camarão é uma matriz alimentar que se degrada mais rapidamente que o atum fresco, uma vez que às mesmas condições de ensaio/armazenamento a concentração destes metabolitos é bastante superior na amostra de camarão. O estudo de (Barbosa 2013), reportou que a deterioração do músculo ocorre de forma mais rápida nos crustáceos do que nos peixes, devido à concentração elevada de metabolitos de baixo peso molecular que provêm da autólise do hepatopâncreas, ou seja, compostos não nitrogenados e aminoácidos livres, que servem de substrato ao crescimento microbiano. O hepatopâncreas, órgão localizado no cefalotórax do camarão, tem uma grande importância no processo de deterioração deste, uma vez que contém um concentrado de suco digestivo. Assim, quando o produto é armazenado inteiro, a manipulação descuidada pode conduzir à diminuição da qualidade do produto, uma vez que, com o desprendimento da cabeça, ocorre o derramamento dos sucos digestivos, e consequentemente inicia-se uma digestão autolítica da carne, justificando a disparidade dos resultados obtidos entre as amostras.

Em ensaios microbiológicos efetuados anteriormente à análise do camarão nos respetivos tempos 0h, 24h, 48h e 120h, foi verificado que a inoculação direta da diluição de amostra de camarão no meio de cultura, não permitia a deteção dos microrganismos presentes na matriz, por esse motivo foi efetuada uma etapa de enriquecimento, 4.3.3 do capítulo 4, Materiais e métodos, para aferir se efetivamente as amostras se encontravam estéreis.

Efetuada a etapa de enriquecimento e posterior inoculação foi possível determinar que a matriz camarão continha inúmeras estirpes bacterianas, não se encontrando estéril.

O fato das bactérias necessitarem de um meio de enriquecimento rico em nutrientes, para serem passíveis de deteção pela técnica das diluições sucessivas, deve-se ao tratamento

atualmente mais utilizado para preservar estes crustáceos, a adição de sulfitos. São utilizados abundantemente na indústria alimentar compostos como o metabissulfito de sódio, bissulfito de sódio ou metabissulfito de potássio, como desinfetantes e antioxidantes (Ligozzi *et al.* 2002).

Estes sulfitos inibem o crescimento das bactérias, podendo em concentrações elevadas, elimina-las. Contudo, a utilização de concentrações acima dos 100 ppm não é aconselhada, uma vez que poderia afetar a saúde do consumidor.

Considerando a Tabela A.1, presente no Anexo, as estirpes detetadas no camarão que possuem a capacidade de produzir aminas biogénicas são as bactérias *Acinetobacter Iwoffii*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Shewanella putrefaciens* e o *Vibrio alginolyticus*. Estas bactérias produzem maioritariamente histidina descarboxilase, com a exceção da bactéria *Shewanella putrefaciens* que apenas produz lisina descarboxilase e ornitina descarboxilase, produzindo apenas a cadaverina e putrescina, respetivamente. Contudo, para além destes microrganismos, foram também detetadas bactérias como a *Aeromonas salmonicida*, descrita na literatura como patogénica para os peixes salmonídeos como a truta, provocando hemorragias internas e externas, nestes animais (Campbell *et al.* 2015). A bactéria *Lactococcus garvieae*, que também apresenta um carácter patogénico, foi também detetada na matriz camarão, afetando maioritariamente peixes de água salgada provenientes do Extremo Oriente. A infeção por *Lactococcus garvieae* causa lesões no endotélio vascular originando hemorragias e petéquias na superfície dos órgãos dos peixes afetados. Apesar de ser um patogénico bastante letal para os peixes, a sua taxa de mortalidade é de 50%, em contra partida nos ser humano esta bactéria é um patogénico raro com baixa virulência na infeção humana (Wang *et al.* 2007).

Ainda assim, na amostra camarão, foram também identificadas bactérias como o *Staphylococcus haemolyticus*, *Vibrio cholerae* e ainda o *Vibrio parahaemolyticus*. A bactéria *Staphylococcus haemolyticus* é um patogénico bastante persistente no organismo humano devido à capacidade de formação de biofilmes, que lhe conferem resistência aos antibióticos. Estas bactérias são comensais do ser humano, contudo, aquando a ingestão de um alimento contaminado com uma quantidade elevada desta bactéria, o paciente sofre dores abdominais, náuseas e vômitos (Pinheiro 2014)

Por último os *Vibrios cholerae* e *parahaemolyticus* são responsáveis por inúmeras intoxicações alimentares, provocando náuseas, vômitos, diarreia e em casos mais graves febre (Rowe *et al.* 2001), ainda assim estes sintomas podem eliminados naturalmente sem recorrer à toma necessária de antibióticos.

6-Conclusão e perspectivas futuras

O método analítico de cromatografia líquida de ultra eficiência, desenvolvido na presente dissertação, revelou ser adequado para o estudo desenvolvido, cumprindo os critérios de controlo de qualidade definidos no laboratório. Os parâmetros de qualidade avaliados determinaram a eficiência da implementação do método para a determinação simultânea das aminas biogénicas histamina, putrescina, cadaverina, tiramina e triptaminas em amostras de pescado, nomeadamente em atum fresco, em atum em conserva e em camarão.

Nas amostras de atum fresco AF1 e AF3 foram detetadas as aminas histamina, putrescina e cadaverina, enquanto que na amostra AF2 apenas foram determinadas as aminas histamina e putrescina. Também nas amostras de atum em conserva, apenas em C3, C4, C7 e C8 foi possível determinar as aminas histamina, putrescina e cadaverina, nas restantes conservas C1, C2, C5 e C6 apenas foram quantificadas as aminas histamina e putrescina. As aminas tiramina e triptamina não foram detetadas em nenhuma das amostras de atum, quer fresco, quer em conserva.

Verificou-se um aumento da concentração dos metabolitos azotados, aquando o aumento da contagem de microrganismos presentes nas amostras de atum fresco. Do ponto de vista da qualidade e da segurança alimentar, após 48h e 120h de refrigeração a 4°C, as matrizes apresentam um elevado estado de deterioração. Embora às 48h de armazenamento não seja atingido em AF1 e AF3, o limite máximo imposto na atualidade para a concentração de histamina em pescado e produtos de pesca, 200 mg/kg, já é notório uma concentração bastante elevada da amina putrescina, que para além de conduzir à formação de nitrosaminas é considerada um forte indicador de putrefação. Contudo, nas amostras de atum em conserva, C1, C2, C3, e C4 as concentrações determinadas para a amina histamina, atingem quase o dobro do valor limite de 200 mg/kg. Este fenómeno pode estar associado a práticas inadequadas de fabrico ou até mesmo à deficiência de higiene ao longo do processo de produção e conservação. A utilização de matérias-primas de baixa qualidade, a inadequação de processos térmicos ou de refrigeração, podem conduzir à formação das quantidades elevadas de histamina observadas.

Também com base na determinação dos microrganismos presentes no atum em conserva, é importante salientar que este deve ser consumido na totalidade aquando o momento de abertura da lata, não promovendo condições térmicas favoráveis ao desenvolvimento da microflora presente no atum, pois como é verificado no presente estudo, mesmo em condições de armazenamento a $3 \pm 2^\circ\text{C}$, existe crescimento bacteriano e consequente formação de aminas biogénicas.

Na amostra de camarão proveniente de aquacultura, a concentração de histamina no tempo 0 às 0 horas, já excede o valor limite legalmente permitido, podendo mais uma vez estar relacionado com más práticas nos processos de produção, conservação e/ou armazenamento.

Futuramente, para o método desenvolvido ao longo do presente estudo, deveria ser completada a validação para a determinação de aminas biogénicas em amostras de pescado e

produtos de pesca, com uma amostragem significativa e com a participação em ensaios interlaboratoriais bem como e se possível com o recurso a materiais de referência certificados.

De futuro, também seria interessante determinar o perfil de aminoácidos, de cada matriz alimentar em estudo, com o intuito de aferir quais as matrizes com maior suscetibilidade à ação das enzimas descarboxilases. Deste modo seria possível quantificar os aminoácidos precursores das aminas biogénicas, de forma a estabelecer possíveis correlações entre estes e o aparecimento das aminas nas diferentes matrizes alimentares.

Ainda como perspetiva futura seria interessante fazer a análise de camarões selvagens, de forma a estabelecer-se uma análise comparativa entre as amostras provenientes de aquacultura (produção intensiva) e as provenientes de captura em águas livres, como oceanos.

Bibliografia

- Abriouel, H., A. Martín, M. Maqueda, E. Valdivia, and M. Martínez. (2008) "Biodiversity of the Microbial Community in a Spanish Farmhouse Cheese as Revealed by Culture-Dependent and Culture-Independent Methods." *International Journal of Food Microbiology* 127(3):200–208.
- Agricultura, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a, ed. (1997) *Garantia de Qualidade de Produtos de Pesca*. Departamento de Investigação dos produtos da pesca Ministério da Agricultura e da Pesca Dinamarca.
- Alencar, D., S. Pires, M. Viana, and F. Arnaldo. (2011) "Aminas Biogénicas Em Macroalgas Marinhas Do Estado Do Ceará, Brasil." *Revista Ciencia Agronomica* 42(2):349–53.
- Anderson, K. (2008) "Biogenic and Volatile Amine-Related Qualities of Three Popular Fish Species Sold at Kuwait Fish Markets." *Food Chemistry* 107(2):761–67.
- Araújo, H., C. Oliveira, H. Cristina, A. Sampaio, and F. Arnaldo. (2004) "Determinação de Histamina Por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa Em Atum e Sardinha Enlatados." 35:179–88.
- ASAE. (2012) "Riscos e Alimentos - Pescado." *Riscos e Alimentos* 1–38.
- Assis, D., L. Menezes, G. Silva, J. Caccioppoli, and E. Santos. (2015) "Aminas Bioativas e Qualidade Da Carne de Frangos de Corte." *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 67(6):1729–34.
- Barbosa, L. (2013) "Qualidade Microbiológica De Camarões Resfriados E Comercializados Em Feiras-Livres Do Município De São Paulo." Dissertação para obtenção do grau mestre em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias_UNESP.
- Bilgin, B. and H. Gençcelep. (2015) "Determination of Biogenic Amines in Fish Products." *Food Science and Biotechnology* 24(5):1907–13.
- Björnsdóttir, K., E. Bolton, L. Jaykus, D. McClellan, and P. Green. (2010) "Development of Molecular-Based Methods for Determination of High Histamine Producing Bacteria in Fish." *International Journal of Food Microbiology* 139(3):161–67.
- Campbell, J., S. Kanters, J. Bennett, C. Tsai, J. Mills, and J. Siedner. (2015) "Comparative Effectiveness of Induction Therapy for Human Immunodeficiency Virus-Associated Cryptococcal Meningitis: A Network Meta-Analysis." *Ofid* 2(Suppl 1):1–8.
- Cardozo, M., K. Lima, C. Tanos, and A. Lima. (2013) "Aminas Biogénicas: Um Problema de Saúde Pública." *Revista Virtual de Química* 5(2):149–68.
- Carrascosa, A. and E. Garci. (2005) "A Rapid and Inexpensive Method for the Determination of Biogenic Amines from Bacterial Cultures By." 68(3):625–29.
- Chen, H., Y. Lee, C. Lin, D. Hwang, and Y. Tsai. (2010) "Determination of Histamine and Bacterial Isolation in Marlin Fillets (*Makaira nigricans*) Implicated in a Foodborne Poisoning." *Journal of Food Safety* 30(3):699–710.
- Comissão Europeia. (2007) *Regulamento (CE) N.º 2073/2005 - Relativo a Critérios*

- Microbiológicos Aplicáveis Aos Géneros Alimentícios*. Vol. 2005R2073.
- Comissão Técnica de Química. (2011) “Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos.” *Inmetro* 20.
- Custódio, F. and É. Tavares. (2007) “Extraction of Bioactive Amines from Grated Parmesan Cheese Using Acid, Alkaline and Organic Solvents.” *Journal of Food Composition and Analysis* 20(3–4):280–88.
- Dias, S. (2013) “Processos de Cura Amarela Do Bacalhau: Dinâmica de Populações Microbianas, Indicadores Químicos e Descritores Sensoriais.” Dissertação de doutoramento em engenharia alimentar, Instituto de agronomia, Lisboa.
- EFSA. (2011) “Scientific Opinion on Risk Based Control of Biogenic Amine Formation in Fermented Foods.” *EFSA Journal* 9(10):2393.
- Emborg, J. and P. Dalgaard. (2006) “Formation of Histamine and Biogenic Amines in Cold-Smoked Tuna: An Investigation of Psychrotolerant Bacteria from Samples Implicated in Cases of Histamine Fish Poisoning.” *Journal of Food Protection* 69(4):897–906.
- Emborg, J., P. Dalgaard, and P. Ahrens. (2006) “Morganella Psychrotolerans Sp. Nov., a Histamine-Producing Bacterium Isolated from Various Seafoods.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56(10):2473–79.
- Eurachem. (2002) “Guide to Quality in Analytical Chemistry - An Aid to Accreditation.” *Eurachem* 17(1):1–40.
- European Commission. (2002) “96/23/EC COMMISSION DECISION of 12 August 2002 Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results (Notified under Document Number C(2002) 3044)(Text WithEEA Relevance) (2002/657/EC).” *96/23/Ec Commission Decision* 29.
- Fallis, A. (2013) *The Prokaryotes*. Vol. 6. edited by S. 3rd edition.
- FAO. (2015) “Fishery and Aquaculture Country Profiles.” *Food and Agriculture Organization of the United Nations Part 1*(Serie 1).
- Faria, A. and D. Mendes. (2011) “Perfil e Teores de Aminas Bioativas Em Frutas Brasileiras.” Faculdade de Farmácia de Minas Gerais, Dissertação de mestrado.
- FDA. (2001) *Recommendations of the United States Public Health Service, Food Code*.
- Fernandes, J., I. Judas, M. Oliveira, I. Ferreira, and M. Ferreira. (2001) “A GC-MS Method for Quantitation of Histamine and Other Biogenic Amines in Beer.” *Chromatographia* 53(S1):S327–31.
- Fernández, M., D. Linares, A. Rodríguez, and M. Alvarez. (2007) “Factors Affecting Tyramine Production in *Enterococcus Durans* IPLA 655.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(6):1400–1406.
- Gomes, M., B. Pires, S. Fracalanza, and V. Marin. (2014) “O Risco Das Aminas Biogénicas Nos Alimentos.” *Ciência & Saúde Coletiva* 19(4):1123–34.
- Gonzaga, V., A. Lescano, A. Huamán, G. Mulanovich, and L. Blazes. (2009) “Histamine Levels in Fish from Markets in Lima, Perú.” *Journal of Food Protection* 72(5):1112–15.
- Gouveia, I. (2013) “Avaliação Da Produção de Aminas Biogénicas Por *Lactobacillus*,

- Staphylococcus e Enterococcus Isolados de Produtos Carneos Fermentados/Fumados Portugueses.” Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.
- Gouveia, N. (2009) “Desenvolvimento de Uma Metodologia Analítica Para Determinação de Aminas Biogénicas Em Tunídeos.” Dissertação de mestrado em Bioquímica, Universidade de Aveiro.
- Hernández, S. and J. Saurina. (2011) “Derivatization Strategies for the Determination of Biogenic Amines in Wines by Chromatographic and Electrophoretic Techniques.” *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879(17–18):1270–81.
- Hwang, C., H. Kung, C. Lin, D. Hwang, and Y. Tsai. (2011) “Bacteriological Quality and Histamine-Forming Bacteria Associated with Fish Meats and Environments in HACCP and Non-HACCP Fish Processing Factories.” *Food Control* 22(10):1657–62.
- Igarashi, K., K. Ito, and K. Kashiwagi. (2001) “Polyamine Uptake Systems in Escherichia Coli.” *Research in Microbiology* 152(3–4):271–78.
- Innocente, N. and P. D’Agostin. (2002) “Formation of Biogenic Amines in a Typical Semihard Italian Cheese.” *Journal of Food Protection* 65(9):1498–1501.
- INSA. (2018) “Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.” Retrieved August 27, 2018 (<http://www.insa.pt/>).
- ISO 11133. (2014) “International Standard Organization- Microbiology of Food, Animal Feed and Water - Preparation, Production, Storage and Performance Testing of Culture Media.”
- ISO 19343. (2007) “International Standard Organization - Microbiology of the Food Chain - Detection and Quantification of Histamine in Fish and Fishery Products - HPLC Method.”
- ISO 21528-2. (2016) “International Standard Organization - Microbiology of the Food Chain — Horizontal Method for the Enumeration of Beta-Glucuronidase-.” (Part 2: Colony-count technique).
- ISO 4833-1. (2013) “International Standard Organization-Microbiology of the Food Chain. Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms.” (Part 1: Colony count at 30°C by the pour plate technique).
- ISO 5725-1. (1994) *International Standard Organization - Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results - Part 1: General Principles and Definitions.*
- ISO 6887-3. (2017) “International Standard Organization- Preparation of Test Samples , Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination.” 2017(Parte 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products).
- ISO 7218. (2014) “International Standard Organization- Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs — General Requirements and Guidance for Microbiological Examinations.” 2014.
- ISO 835. (2007) “International Standard Organization- Laboratory Glassware - Graduated Pipettes.”
- ISO 9001. (2015) *International Standard Organization - Sistemas de Gestão de Qualidade.*
- Ivanov, G., I. Ivanova, A. Slavchev, and K. Vassilev. (2015) “Biogenic Amines and Their Role as

- Index of Freshness in Chicken Meat.” *Journal of Applied Life Sciences International* 3(2):55–62.
- Izquierdo, C., J. Gómez, C. Nebel, L. Pardo, and A. Gonzalez. (2018) “Identifying Human Diamine Sensors for Death Related Putrescine and Cadaverine Molecules.” *PLoS Computational Biology* 14(1):1–20.
- Jornal de Notícias. (2017) “Portugal Afetado Por Intoxicação Com Atum Espanhol Adulterado.” Retrieved August 25, 2018 (<https://www.jn.pt/mundo/interior/portugal-afetado-por-intoxicacao-com-atum-espanhol-adulterado-8804169.html>).
- Judas, I. (2000) “Evolução Do Teor de Aminas Biogénicas Ao Longo Do Fabrico e Armazenamento de 2 Formulações de Enchidos Secos Correlação Com Parâmetros de Estabilidade.” Dissertação para obtenção do grau mestre em Controlo de Qualidade, Faculdade de Veterinária da Universidade do Porto.
- Kim, S., K. Field, M. Morrissey, and R. Price. (2001) “Source and Identification of Histamine-Producing Bacteria from Fresh and Temperature-Abused Albacore.” *Journal of Food Protection* 64(7):1035–44.
- Komprda, T., J. Neznalová, S. Standara, and S. Bover-Cid. (2001) “Effect of Starter Culture and Storage Temperature on the Content of Biogenic Amines in Dry Fermented Sausage Poličan.” *Meat Science* 59(3):267–76.
- Křížek, M., F. Vácha, L. Vorlová, J. Lukášová, and Š. Cupáková. (2004) “Biogenic Amines in Vacuum-Packed and Non-Vacuum-Packed Flesh of Carp (*Cyprinus Carpio*) Stored at Different Temperatures.” *Food Chemistry* 88(2):185–91.
- Ladero, V., E. Sánchez-Llana, M. Fernández, and M. Alvarez. (2011) “Survival of Biogenic Amine-Producing Dairy LAB Strains at Pasteurisation Conditions.” *International Journal of Food Science and Technology* 46(3):516–21.
- Lee, Y., B. Kim, J. Kim, W. Yoon, S. Bang, and Y. Park. (2007) “CadC Has a Global Translational Effect during Acid Adaptation in *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium.” *Journal of Bacteriology* 189(6):2417–25.
- Leisner, J., C. Millan, H. Huss, and M. Larsen. (2002) “Production of Histamine and Tyramine by Lactic Acid Bacteria Isolated from Vacuum Packed Sugar Salted Fish.” *Journal of Applied Bacteriology* 76(5):417–23.
- Ligozzi, M., C. Bernini, M. Bonora, Z. Fatima, and F. Jessica. (2002) “Evaluation of the VITEK 2 System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Medically Relevant Gram-Positive Cocci.” *Journal of Clinical Microbiology* 40(5):1681–86.
- Linares, D., M. Cruz, V. Ladero, M. Alvarez, and M. Fernández. (2011) “Biogenic Amines in Dairy Products.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51(7):691–703.
- Luiz, V. and M. Silva. (2014) “Aminas Biogénicas Como Indicadores de Qualidade de Salames e Produtos Cárneos Fermentados.” (October).
- Maia, M. (2015) “Ocorrência de Histamina Em Produtos Alimentares Disponíveis No Mercado : Qual o Risco Do Seu Consumo ?” Dissertação de mestrado em Segurança Alimentar, Universidade de Coimbra.

- Manetta, A., L. Di Giuseppe, R. Tofalo, and M. Martuscelli. (2016) "Evaluation of Biogenic Amines in Wine: Determination by an Improved HPLC-PDA Method." *Food Control* 62:351–56.
- Marinét, A., C. Vidal, M. Izquierdo, T. Veciana, and T. Hernandez. (1995) *Les Amines Biogènes Dans Les Aliments : Leur Signification, Leur Analyse*.
- Martínez, C., J. Frías, P. Gulewicz, K. Gulewicz, and C. Vidal. (2008) "Food Safety Evaluation of Broccoli and Radish Sprouts." *Food and Chemical Toxicology* 46(5):1635–44.
- Mendes, A., A. Coelho, and R. Azeredo. (2011) "Contaminação Por *Bacillus Cereus* Em Superfícies de Equipamentos e Utensílios Em Unidade de Alimentação e Nutrição." *Ciência & Saúde Coletiva* 16(9):3933–38.
- Mendes, R. (2018) "Implementação e Validação Do Método Analítico Para Determinação de Histamina Em Amostras de Pescado e Produtos Da Pesca Por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)."
- Molenaar, D., J. Bosscher, B. Brink, A. Driessen, and W. Konings. (1993) "Generation of a Proton Motive Force by Histidine Decarboxylation and Electrogenic Histidine/Histamine Antiport in *Lactobacillus Buchneri*." *Journal of Bacteriology* 175(10):2864–70.
- Montanha, A. (2016) "Aminas Biogénicas e Polifenóis No Leite e Queijo de Ovelhas Da Raça Bergamácia Suplementadas Com Óleo Ou Farelo de Linhaça (*Linum Usitatissimum* L.)." Pós graduação em Zootecnia, UNESP.
- Monteiro, M., E. Mársico, C. Teixeira, S. Mano, and H. Vital. (2012) "Validade Comercial de Filés de Tilápia Do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) Resfriados Embalados Em Atmosfera Modificada e Irradiados." *Ciência Rural* 42(4):737–43.
- Moret, S. and S. Conte. (1996) "High-Performance Liquid Chromatographic Evaluation of Biogenic Amines in Foods an Analysis of Different Methods of Sample Preparation in Relation to Food Characteristics." *Journal of Chromatography A* 729(1–2):363–69.
- Morii, H. and K. Kasama. (2004) "Activity of Two Histidine Decarboxylases from *Photobacterium Phosphoreum* at Different Temperatures, PHs, and NaCl Concentrations." *Journal of Food Protection* 67(8):1736–42.
- Mota, C., M. Santos, R. Mauro, N. Samman, A. Matos, and I. Castanheira. (2016) "Protein Content and Amino Acids Profile of Pseudocereals." *Food Chemistry* 193:55–61.
- Nicolau, P. (2014) "Microorganismos e Crescimento Microbiano." Universidade aberta de Lisboa.
- Norma Portuguesa (NP) 4490. (2009) "Produtos Da Pesca e Da Aquicultura - Determinação Do Teor de Histamina."
- Novella-Rodríguez, Sonia, M. Teresa Veciana-Nogués, Artur X. Roig-Sagués, Antonio J. Trujillo-Mesa, and M. Carmen Vidal-Carou. (2004) "Evaluation of Biogenic Amines and Microbial Counts throughout the Ripening of Goat Cheeses from Pasteurized and Raw Milk." *The Journal of Dairy Research* 71(2):245–52.
- Oliveira, M. (2007) "Tratamento de Infecções Causadas Por *Acinetobacter* Spp . Resistente a Carbapenem." Dissertação de mestrado em Ciências, Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo.

- Olivo, G. (2013) "Validação e Estimativa Da Incerteza de Medição de Um Método Para Determinação de Aminas Biogênicas Por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Em Matriz de Atum (*Thunnus Spp*).” Dissertação de mestrado em ciências dos alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Önal, A. (2007) "A Review: Current Analytical Methods for the Determination of Biogenic Amines in Foods." *Food Chemistry* 103(4):1475–86.
- Özogul, F., V. Šimat, S. Gokdogan, J. Regenstein, and Y. Özogul. (2018) "Effect of Natural Zeolite (Clinoptilolite) on in Vitro Biogenic Amine Production by Gram Positive and Gram Negative Pathogens." *Frontiers in Microbiology* 9(October):1–8.
- Pacheco, S., G. Borguini, A. Santiago, and S. Nascimento. (2015) "History of Liquid Chromatography." *Revista Virtual de Química* 7(4):1225–71.
- Parlamento Europeu e do Conselho. (2002) "Regulamento (CE) N° 178/2002 - Normas Gerais Da Legislação Alimentar Para a Segurança Dos Alimentos." *Jornal Oficial Da União Europeia* 188:44.
- Pereira, V. (2014) "Avaliação Do Prazo de Validade de Conservas de Peixe Após Abertura." Dissertação de mestrado em Controlo de Qualidade, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Pincus, H. (2010) "Microbial Identification Using the BioMérieux VITEK® 2 System." *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods* 1–32.
- Pinheiro, L. (2014) "Staphylococcus Epidermidis e S Taphylococcus Haemolyticus : Detecção de Genes Codificadores de Biofilme , Toxinas , Resistência a Antimicrobianos e Tipagem Clonal Em Isolados de Hemoculturas Staphylococcus Epidermidis e S Taphylococcus Haemolyticus : Dete."
- Pinheiro, W. (2015) "Controle Da Qualidade Do Ensaio de Histamina Em Pescado." Dissertação de mestrado em Ciência dos Alimentos, Faculdade de Farmácia de Minas Gerais, Brasil.
- Polo, L., S. Ferrer, A. Peña, P. Hernández, and I. Pardo. (2011) "Biogenic Amine Synthesis in High Quality Tempranillo Wines. Relationship with Lactic Acid Bacteria and Vinification Conditions." *Annals of Microbiology* 61(1):191–98.
- Porto, H. (2014) "HPLC versus UPLC : Avaliação de Aspetos Críticos à Transferência e Validação de Métodos Analíticos." 118.
- Preedy, Victor R., Ronald Ross Watson, and Vinood B. Patel, eds. (2013) *Handbook of Cheese in Health*. Vol. 6. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Premont, R., R. Gainetdinov, and M. Caron. (2001) "Following the Trace of Elusive Amines." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(17):9474–75.
- Prester, L. (2011) "Biogenic Amines in Fish, Fish Products and Shellfish: A Review." *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 28(11):1547–60.
- Prester, Ljerka. (2011) "Biogenic Amines in Fish, Fish Products and Shellfish: A Review." *Food Additives & Contaminants: Part A* 28(11):1547–60.

- Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro. (2006) “Métodos de Amostragem e de Análise Para o Controlo Oficial Dos Teores de Micotoxinas Nos Géneros Alimentícios.” *Jornal Oficial Da União Europeia* L70:12–34.
- Relacre. (2000) *Guia Relacre: Validação de Métodos Internos de Ensaio Em Análise Química*. Vol. 13. edited by A. de L. A. de Portugal.
- Ribani, M., C. Bottoli, C. Collins, I. Jardim, and L. Melo. (2004) “Validação Em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos.” *Química Nova* 27(5):771–80.
- Rivas, B., R. González, J. Landete, and R. Munoz. (2008) “Characterization of a Second Ornithine Decarboxylase Isolated from *Morganella morganii*.” *Journal of Food Protection* 71(3):657–61.
- Rodriguez, Mariana Bacellar Ribas, Carla da Silva Carneiro, Marcia Barreto da Silva Feijó, Carlos Adam Conte Júnior, and Sérgio Borges Mano. (2014) “Bioactive Amines: Aspects of Quality and Safety in Food.” *Food and Nutrition Sciences* 05(02):138–46.
- Roig, A., M. Hernández, E. López, and J. Rodríguez. (1997) “Evaluation of Three Decarboxylating Agar Media to Detect Histamine and Tyramine-Producing Bacteria in Ripened Sausages.” *Letters in Applied Microbiology* 25(5):309–12.
- Rossano, R., L. Mastrangelo, N. Ungaro, and P. Riccio. (2006) “Influence of Storage Temperature and Freezing Time on Histamine Level in the European Anchovy *Engraulis encrasicolus* (L., 1758): A Study by Capillary Electrophoresis.” *Journal of Chromatography B* 830(1):161–64.
- Rowe, D., A. Guerout, P. Ploncard, B. Dychinco, J. Davies, and D. Mazel. (2001) “The Evolutionary History of Chromosomal Super-Integrations Provides an Ancestry for Multiresistant Integrations.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(2):652–57.
- Sabaini, Priscila Seixas. (2009) “Métodos de Análise e Determinação de Aminas Livres e Conjugadas Em Uvas e Vinhos.” *Tese* 104.
- Schiller, D., D. Kruse, H. Kneifel, and A. Burkovski. (2000) “Polyamine Transport and Role of PotE in Response to Osmotic Stress in *Escherichia coli*.” *Society* 182(21):6247–49.
- Souza, A., F. Mesquita, E. Packness, M. Azeredo, and D. Perdomo. (2015) “Histamina e Rastreamento de Pescado: Revisão de Literatura.” *Arquivos Do Instituto Biológico* 82(0):1–11.
- Spano, G., P. Russo, A. Lonvaud, and P. Lucas. (2010) “Biogenic Amines in Fermented Foods.” *European Journal of Clinical Nutrition* 64:S95–100.
- Suzzi, G. and F. Gardini. (2003) “Biogenic Amines in Dry Fermented Sausages: A Review.” *International Journal of Food Microbiology* 88(1):41–54.
- Takahashi, H., B. Kimura, M. Yoshikawa, and T. Fujii. (2003) “Cloning and Sequencing of the Histidine Decarboxylase Genes of Gram-Negative, Histamine-Producing Bacteria and Their Application in Detection and Identification of These Organisms in Fish.” *Applied and Environmental Microbiology* 69(5):2568–79.
- Tapingkae, W., S. Tanasupawat, K. Parkin, S. Benjakul, and W. Visessanguan. (2010) “Degradation of Histamine by Extremely Halophilic Archaea Isolated from High Salt-

- Fermented Fishery Products.” *Enzyme and Microbial Technology* 46(2):92–99.
- Tembhurne, M., A. Ghag, Hi. Sanathkumar, and B. Nayak. (2013) “Dominance of Enterobacteria among Histamine-Producing Bacteria Isolated from Indian Mackerel.” *Advances in Microbiology* 2013(November):537–42.
- Toldrá, F. and L. Nollet. (2013) *Food Analysis by HPLC*. 3rd editio. edited by T. & F. Group.
- Trabulsi, L. and F. Alterthum. (2015) *Microbiologia*. edited by A. 6th edition.
- Valsamaki, K., A. Michaelidou, and A. Polychroniadou. (2000) “Biogenic Amine Production in Feta Cheese.” *Food Chemistry* 71(2):259–66.
- Wang, C., H. Shie, S. Chen, J. Huang, I. Hsieh, M. Wen, F. Lin, and D. Wu. (2007) “Lactococcus Garvieae Infections in Humans: Possible Association with Aquaculture Outbreaks.” *International Journal of Clinical Practice* 61(1):68–73.
- Waters. (2018) “Best UPLC/UHPLC System for Nano- to Microscale Separations.” Retrieved August 27, 2018 (http://www.waters.com/waters/en_US/Best-UPLC-UHPLC-system-for-nano--to-microscale-separations/nav.htm?cid=134776759&locale=en_US).
- WHO. (2018) “World Health Organization.” Retrieved August 27, 2018 (<http://www.who.int/>).
- Yeragani, V. and T. Sathyanarayana. (2009) “Hypertensive Crisis and Cheese.” *Indian Journal of Psychiatry* 51(1):65.

Anexo A

Tabela A.1: Espécies bacterianas produtoras de aminos biogénicas

Anexo A

Tabela A.1: Espécies bacterianas produtoras de aminas biogénicas

Bactéria Gram-Positivas	1	2	3	4	5	6	Bactéria Gram-Negativa	1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-	-	-	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Betabacterium buchneri</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Betabacterium beve</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Edwardsiella speiz</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Betabacterium fermenti</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Carnobacterium divergens</i>	-	+	-	-	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Carnobacterium gallinarum</i>	-	+	-	-	-	+	<i>Enterococcus agglomerans</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Carnobacterium maltaromicus</i>	-	+	-	-	-	-	<i>Enterococcus durans</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Carnobacterium piscicola</i>	-	+	-	-	-	+	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	-	+
<i>Clostridium aerofaecium</i>	-	+	-	-	-	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Clostridium perfringens</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	+	-	-	-	-	<i>Escherichia freundii</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Kocuria varians</i>	-	+	-	+	+	-	<i>Hafnia alvei</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	+	-	-	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	+	+	-	-	-	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+	-	-	-
<i>Lactobacillus bavaricus</i>	+	+	+	+	-	-	<i>Morganella morganii</i>	+	-	-	+	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	+	+	+	+	+	-	<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	-	-	+	-
<i>Lactobacillus buchneri</i>	+	+	-	+	-	-	<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	+	+	-	-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus carnis</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	+	-	+	+	-	-	<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus curvatus</i>	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas reptilivora</i>	+	+	-	-	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	+	+	-	-	-	+	<i>Salmonella Arizona</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus divergens</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Salmonella dublin</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus farcimines</i>	-	+	-	-	-	+	<i>Salmonella typhi</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Schewanella putrefaciens</i>	-	-	+	+	-	-
<i>Lactobacillus frigidus</i>	-	+	-	-	-	-	<i>Serratia marescens</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	+	-	+	-	-	-	<i>Shigella boydii</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	-	+	-	-	-	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	+	+	+	<i>Shigella sonnei</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Vibrio alginolyticus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	-	-	+	-							
<i>Leuconostoc cremoris</i>	-	+	-	-	+	-	Bactérias Gram-positivas (cont.)	1	2	3	4	5	6
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	-	-	+	-							
<i>Leuconostoc oenos</i>	-	+	-	-	-	-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	+	-	+	-	-
<i>Micrococcus kristinae</i>	-	-	-	+	-	-	<i>Staphylococcus xylosus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	+	-	-	-	-	<i>Streptococcus cremoris</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Oenococcus oeni</i>	+	+	-	-	-	-	<i>Streptococcus durans</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Pediococcus acidilactici</i>	-	+	-	-	-	-	<i>Streptococcus faecalis</i>	+	+	-	-	-	+
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Streptococcus faecium</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	+	-	-	-	-	<i>Streptococcus lactis</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus carnosus</i>	-	+	+	+	-	+	<i>Streptococcus mitis</i>	+	+	-	-	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-	-	+	-	+	<i>Streptococcus liquefaciens</i>	-	+	-	-	+	-
<i>Staphylococcus piscifermentans</i>	-	+	-	-	-	-	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	+	-	-	+	-

1-Histamina, 2- Tiramina, 3- Cadaverina, 4- Putrescina, 5- Triptamina, 6- β-Feniletilamina, (+) Espécie Amino-positiva, (-) Espécie Amino-negativa, Adaptado de Judas, 2000

Anexo B

Abstracts dos pósteres aceites em:

32nd EFFoST International Conference

Developing innovative food structures and functionalities through process and reformulation to satisfy consumer needs and expectations

6-8 november 2018 | Nantes, France

5^o Simpósio Nacional SPASS

Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura

Perigos microbiológicos- Estratégias e perspetivas

27 de setembro de 2018 | Lisboa, Portugal

11.^a Reunião Anual PortFIR

“Partilhar e Cooperar para uma Alimentação Saudável”

25 e 26 de outubro de 2018 | Lisboa, Portugal

Anexo B1

Title:

Monitoring of five biogenic amines and microbiologic profile in fish matrices in different storage conditions

Authors & affiliations:

Inês Pereira^{1,2}, Rosália Furtado², Inês Delgado², Susana Jesus², Ana Leitão¹, Carla Motta²

¹*Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal;*

²*Department of Food and Nutrition, National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisbon, Portugal.*

Abstract: (Your abstract must use **Normal style** and must fit in this box. Your abstract should be no longer than 300 words. The box will 'expand' over 2 pages as you add text/diagrams into it.)

Biogenic amines are low molecular weight nitrogen compounds that result from the action of microbial metabolism from free amino acids, mainly produced by *Enterobacteriaceae*, during spoilage and fermentation of fish and fish products.

The presence of biogenic amines in foodstuffs may lead to intolerance or food poisoning, especially due to the consumption of high concentrations of histamine. The action of histamine can be potentiated by the presence of other biogenic amines, such as putrescine and cadaverine, considered the most reliable indicators of fresh fish quality.

The purpose of this study was to detect and quantify in simultaneous five biogenic amines, histamine, tryptamine, tiramine, cadaverine and putrescine, by ultra performance liquid chromatography (UPLC[®]) coupled with a Photodiode Array (PAD) detector, using the AccQ Fluor reagent from Waters[®] (AccQ-Tag[™] Ultra kit), as derivating agent.

The analytical assays, were performed in two food samples tuna and shrimp purchased on the market during their shelf-life. These products were analyzed after storage at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ during 48h, 72h, 120h and 240h. At the same time, microbiological quantification was performed to establish a correlation between the level (cfu/g) of biogenic amine-producing bacteria present and the concentration (mg/Kg) of biogenic amines produced.

The results obtained showed that between 48h to 240h, the level of microorganisms increased ($2 \log_{10}$ cfu/g) and the bacteria detected such as *Enterobacteriaceae*, *Vibrio*, *Pseudomonas* and *Aeromonas*, as well as increased histamine concentrations (43,5 mg/Kg - > 200 mg/Kg), failing the regulated histamine level, are in accordance with the described in the scientific literature.

This study indicates that the concentration of biogenic amines is affected by the growth of biogenic amine producers under the influence of temperature and time, fundamental contributory factors for the microbiological quality and safety of fish and fish products.

Key words: Biogenic amines, Microorganisms, UPLC[®], Histamine, Fish quality

Anexo B2

PRESENÇA DE AMINAS BIOGÉNICAS E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA EM CONSERVAS DE ATUM

Inês Pereira^{1,2}, Rosália Furtado², Cristina Belo Correia², Ana Leitão¹, Carla Motta²

¹*Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa,
2829-516 Caparica, Portugal;*

²*Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo
Jorge Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal.*

As amins biogénicas são compostos de baixo peso molecular que resultam da ação do metabolismo microbiano, especialmente bactérias do grupo das *Enterobacteriaceae*, sobre aminoácidos livres presentes em certos alimentos. Estes metabolitos podem ser determinados em vários tipos de matrizes alimentares, contudo, em géneros alimentícios com elevado teor de proteína, como peixe e carne processada, a probabilidade de formação destes compostos é bastante superior.

O consumo de alimentos com elevada concentração de amins biogénicas, especialmente tiramina e histamina, pode provocar sintomas muito semelhantes aos de uma reação alérgica, podendo incluir também outro tipo de manifestações neurológicas e gastrointestinais como náuseas, vómitos e diarreia.

Neste estudo foram realizados ensaios em oito marcas diferentes de atum em conserva ao natural. O objetivo foi identificar e quantificar, em simultâneo, cinco amins biogénicas, histamina, triptamina, tiramina, cadaverina e putrescina, por cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC®). A metodologia analítica incluiu a extração das amins com ácido tricloroacético 5% e a separação e quantificação das mesmas por UPLC® de fase reversa, acoplado a um detetor PAD e mediado pelo reagente AccQ Fluor da Waters® (kit AccQ-TagTM Ultra®). Em paralelo foram realizados ensaios microbiológicos para detetar a presença de bactérias aeróbias e anaeróbias produtoras de amins. A presença de microrganismos aeróbios e anaeróbios foi detetada por métodos culturais. Para efetuar a identificação bioquímica das estirpes isoladas utilizou-se o equipamento Vitek® Compact 2.

Os resultados obtidos evidenciaram que as concentrações máximas das amins identificadas histamina, putrescina e cadaverina, foram $521 \pm 43,1$ mg/kg; $2844 \pm 32,5$ mg/kg e $52,8 \pm 3,56$ mg/kg, respetivamente, e as concentrações mínimas foram $32,6 \pm 8,41$ mg/kg para a histamina, $648 \pm 58,00$ mg/kg para a putrescina e $19,7 \pm 5,47$ mg/kg para a cadaverina. As amins tiramina e triptamina não foram detetadas, em nenhuma das unidades analíticas de atum em conserva selecionadas para o estudo.

Nos ensaios microbiológicos efetuados, em duas das oito amostras testadas não foi observado qualquer desenvolvimento microbiano.

Foram identificadas as espécies bacterianas, *Staphylococcus warneri* em 4 marcas, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus hominis*, em 1 marca e *Staphylococcus epidermidis* em 2

marcas. Destas estirpes apenas *Staphylococcus epidermidis* é reconhecido como produtor de histamina e putrescina, as restantes estirpes não estão associadas à produção de enzimas descarboxilases.

A metodologia utilizada neste estudo revelou-se adequada para a quantificação dos analitos analisados. Das 8 amostras de atum em conservas estudadas, 6 apresentaram valores de histamina superiores aos valores máximos estabelecidos na legislação europeia. No entanto, apenas em 2 das 8 marcas foi detetada a presença de microrganismos produtores de histamina.

A formação de níveis elevados de histamina pode estar relacionada, entre outros fatores, com procedimentos inadequados de embalagem e refrigeração, com o incumprimento das boas práticas de higiene e de fabrico durante o processo produtivo ou ainda com a utilização de matérias-primas de baixa qualidade. De salientar no entanto que, apesar da maioria dos microrganismos produtores de aminas, serem eliminados durante o processo de produção das conservas, uma vez formados, estes compostos, já não são destruídos.

Anexo B3

RELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE AMINAS BIOGÉNICAS E A POPULAÇÃO MICROBIANA PRESENTE EM CAMARÕES DE AQUACULTURA

Inês Pereira^{1,2}, Rosália Furtado², Cristina Belo Correia, Ana Leitão¹, Carla Motta²

¹*Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal;*

²*Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisbon, Portugal.*

As aminas biogénicas são metabolitos, produzidos pela flora microbiana, que resultam da descarboxilação de aminoácidos livres, presentes nas matrizes alimentares.

Estes compostos são frequentemente determinados em alimentos com elevado teor de proteína como o peixe e a carne, ou que foram sujeitos a processos de fermentação como o queijo e o vinho. Estes metabolitos, para além de desempenharem um papel vital nos organismos vivos, também podem desencadear efeitos tóxicos que apenas são evidentes quando a sua concentração nos alimentos consumidos é muito elevada.

O objetivo deste estudo foi detetar e quantificar cinco aminas biogénicas em simultâneo, histamina, triptamina, tiramina, cadaverina e putrescina, por cromatografia líquida de ultra pressão (Acquity, UPLC[®], Waters[®]) acoplada a um detetor PAD. O estudo foi realizado em amostras de camarão de aquacultura, adquiridas em superfícies comerciais na região de Lisboa.

A amostra foi armazenada sob refrigeração a 4°C, durante um período de 5 dias. A determinação e quantificação das cinco aminas foram realizadas após 0, 24, 48 e 120 horas. Foram efetuados ensaios microbiológicos nos mesmos períodos de tempo, para averiguar a existência e eventual relação, entre o número de bactérias produtoras de aminas, presentes nas amostras e a quantificação dos metabolitos.

Ao longo do ensaio, a concentração de aminas biogénicas foi aumentando determinando-se às 0h do ensaio a concentração de 1143 ± 224 mg/kg para a histamina, $980,1 \pm 210,5$ mg/kg para a putrescina e $127 \pm 28,6$ mg/kg para a cadaverina, e às 120h de refrigeração a concentração, 3790 ± 672 mg/kg para a histamina, 2498 ± 450 mg/kg para a putrescina e 578 ± 135 mg/kg para a cadaverina. As aminas tiramina e triptamina não foram detetadas na amostra.

Nos ensaios microbiológicos, verificou-se um crescimento exponencial das 0h para as 120h e identificaram-se as estirpes *Acinetobacter Iwoffii*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Shewanella putrefaciens* e *Vibrio Cholerae* como bactérias produtoras de histidina descarboxilase.

O método revelou-se adequado para a quantificação dos analitos em estudo. Aquando o momento de aquisição (T 0h de ensaio) a concentração de histamina já ultrapassava o valor legalmente permitido (200mg/kg) para este metabolito.

Implementação do método analítico para determinação de aminas biogénicas em amostras de pescado e produtos de pesca. Avaliação de processos para a sua formação

A presença de concentrações elevadas de aminas nas matrizes alimentares, encontra-se geralmente relacionadas com técnicas de produção inadequadas, bem como das condições incorretas de armazenamento.